

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

```
IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      -----
MSKLI EYDETARRAMEVGM DKLADTVRVTLGPRGRHVVLAKAFGGPTVTN 50

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      -----
DGVTVAREIELEDPFEDLGAQLVKSVATKTNDVAGDGT TATILAQALIK 100

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      -----
GGLRLVAAGVNP IALGVGIGKAADAVSEALLASATPVSGKTGIAQVATVS 150

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      -----
SRDEQIGDLVGEAMSKVGH DGVVSVEESSTLGTELEFTEGIGFDKGFLSA 200

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      -----
YFVTDFDNQQAVLE DALILLHQDKISSLPDLLPLEKVAGTGKPLLIVAE 250

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      ---GXXXXXLXX-----XXPXXX-----FXX-----XXXX 22
DVEGEALATLVVNAIRKTLKAVAVKGPYFGDRRKAFLEDLAVVTGGQVVN 300
      *      *                      *      *

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      PXXGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXIXX-----VXXXX-----VX----- 53
PDAGMVLREVGLEVLGSARRVVVSKDDTVIVDGGGTAEAVANRAKHLRAE 350
      *      *                      :      :      *

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      ----XDFN----- 57
IDKSDSDWDREKLGERLAKLAGGVAVIKVGAATETALKERKESVEDAVAA 400
      *::

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      -----
AKAAVEEGIVPGGGASLIHQARKALTEL RASLTGDEV LGVDVFSEALAAP 450

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      -----
LFWIAANAGLDG SVVVNKVSELPA GHGLNVNTLSYGD LAADGVIDPVKVT 500

IF Domain
gi|1449370|emb|CAB01006.1|      -----
RSAVLNASSVARMVLT TETVVVDKPAKAEDHDH HHGHAH 539
```

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

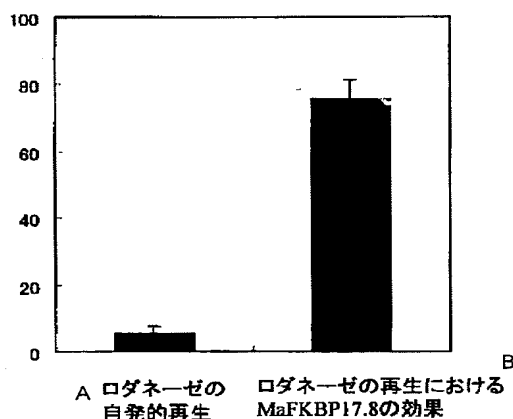
(10) 国際公開番号
WO 2005/063964 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 1/21, 9/90, 15/61, C07K 16/40, 19/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019306
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 24 日 (24.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-430723
2003 年 12 月 25 日 (25.12.2003) JP
特願 2004-300594
2004 年 10 月 14 日 (14.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 積水化学工業株式会社 (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5308565 大阪府大阪市北区西天満 2 丁目 4 番 4 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 井手野 晃 (IDENO, Akira) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山 2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 西口 直樹 (NISHIGUCHI, Naoki) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山 2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP). 古谷 昌弘 (FURUTANI, Masahiro) [JP/JP]; 〒6188589 大阪府三島郡島本町百山 2-1 積水化学工業株式会社内 Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: FKBP TYPE PPIASE, EXPRESSION VECTOR, TRANSFORMANT, FUSED PROTEIN, METHOD OF PRODUCING FUSED PROTEIN, METHOD OF PRODUCING TARGET PROTEIN, METHOD OF PURIFYING FKBP TYPE PPIASE AND METHOD OF PURIFYING FUSED PROTEIN

(54) 発明の名称: FKBP 型 P P I a s e、発現ベクター、形質転換体、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、目的タンパク質の製造方法、FKBP 型 P P I a s e の精製方法、及び融合タンパク質の精製方法



A SPONTANEOUS REGENERATION OF RHODANESE
B EFFECT OF MaFKBP17.8 ON REGENERATION OF RHODANESE

(57) Abstract: It is intended to produce a target protein at a high efficiency with the use of the action of FKBP type PPIase which shows a sufficient activity in a region from low temperature to ordinary temperature in usual biochemical environment. Owing to the action of FKBP type PPIase originating in a non-thermophilic archaeobacterium belonging to methane-producing bacteria, a target protein is obtained as a normal protein. By a fused protein composed of FKBP type PPIase with the target protein or the coexpression of the FKBP type PPIase with the target protein, the target protein can be properly folded. By using a vector which can express the fused protein, the target protein can be produced at a high efficiency.

(57) 要約: 低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下でも十分な活性を示す FKBP 型 P P I a s e の作用により、目的タンパク質を高効率で製造

[続葉有]



(74) 代理人: 藤田 隆 (FUJITA, Takashi); 〒5300044 大阪府
大阪市北区東天満 2 丁目 1 0 番 1 7 号 マツビル
5 階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,

SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

することを課題とする。メタン生成菌に属する常温性古細菌由来のFKBP型PPIaseの作用により、目的タンパク質を正常型タンパク質として取得する。該FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質、又は該FKBP型PPIaseと目的タンパク質の共発現により目的タンパク質は正しく折り畳まれる。該融合タンパク質を発現することができるベクターによって、目的タンパク質は高効率で製造される。

明 細 書

FKBP型PPIase、発現ベクター、形質転換体、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、目的タンパク質の製造方法、FKBP型PPIaseの精製方法、及び融合タンパク質の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、FKBP型PPIase、発現ベクター、形質転換体、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、目的タンパク質の製造方法、FKBP型PPIaseの精製方法、及び融合タンパク質の精製方法に関し、さらに詳細には、低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下でも十分な活性を示すFKBP型PPIase、該FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができる発現ベクター、該発現ベクターを含有する形質転換体、FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質とその製造方法、該FKBP型PPIaseを利用した目的タンパク質の製造方法、疎水性相互作用クロマトグラフィーによる該PPIaseの精製方法、及び疎水性相互作用クロマトグラフィーによる該融合タンパク質の精製方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、種々の生物のゲノム解析が終了しつつあり、今後の研究は、遺伝子の発現産物であるタンパク質の網羅的な機能解析へと進むものと考えられている。即ち、個々のタンパク質の性質を明らかにするとともに、タンパク質同士の相互作用を網羅的に解析することで、生命現象解明の一助としようとする研究が急速に増加しつつある。なかでも、各種の生理活性物質と特異的に結合し、その作用を伝達する細胞内受容体タンパク質は、その受容体タンパク質と結合する活性物質が新規医薬品の候補物質となり得ることから、その3次元構造決定に重大な関心が持たれている。

[0003] タンパク質の性質を決定しようとする場合は、そのタンパク質を組換えDNA技術によって大量に合成し、解析試料とすることが多い。即ち、目的タンパク質をコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、該発現ベクターをバクテリア、酵母、昆虫細胞等の宿主に導入し、宿主内で目的タンパク質の遺伝子を発現させ、得られた組換えタンパク質の性質を調べる方法が一般的である。しかし、タンパク質の性質を正確に評

価するためには、一次構造のみならず三次元的な立体構造が極めて重要であるところ、上記のようにして得られた組換えタンパク質においては、宿主内で折り畳み反応が正しく行われず、正しい立体構造を有しない異常型タンパク質としてしか得られないケースにしばしば遭遇する。さらに、このような異常型タンパク質は可溶性ではなく封入体と呼ばれる不溶性の凝集体として得られることが多い。例えば、目的タンパク質が抗体の場合、大腸菌を宿主とすると、合成された組換えタンパク質のほとんどが不溶性の封入体となることが知られている(非特許文献1)。また、細胞内受容体タンパク質のように、元々は生体膜の表面上または内部に埋もれて存在しているタンパク質が目的タンパク質である場合も、組換えタンパク質として発現させると封入体になりやすい。

[0004] また、組換えタンパク質が宿主細胞のプロテアーゼにより分解されたりしてしまい、解析対象の目的タンパク質がほとんど得られない場合もある。さらに、目的タンパク質が細胞に対する毒性を示す場合には、組換えタンパク質は発現にすら至らないこともある。

[0005] 封入体となった異常型タンパク質を折り畳み直して正しい立体構造に戻す方法としては、封入体を高濃度の塩酸グアニジンや尿素等で可溶化した後、適当な緩衝液等で30〜100倍程度に希釈する方法が知られている。例えば、特許文献1には、封入体を含む希釈した緩衝液中にタンパク質の折り畳みを促進する機能を有するシャペロニンを含むことで、異常型タンパク質を正しく折り畳み、目的タンパク質を正常型タンパク質として取得する方法が記載されている。しかしながら、いったん封入体となった異常型タンパク質を折り畳み直して正しい立体構造に戻すことは予想以上に困難であり、上記した方法でもなかなか成功しないのが現実である。さらに、シャペロニンは、折り畳み反応の際に高エネルギー物質であるATP等のヌクレオチド3リン酸を必要とし、経済的に不利である。また、シャペロニンは分子量80万〜100万の巨大な分子であるので、折り畳み反応に用いるには重量比にすると極めて多大な量が必要とされ、やはり経済的に不利である。

[0006] また、目的タンパク質を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、マルトース結合蛋白質(MBP)、NusAなどの作用により正常型タンパク質として

取得する方法が提案されているが、いずれもその効果は十分とはいえない。

[0007] 一方、発現産物の収量を向上させることを目的とした方法もいくつか開示されている。特許文献2には、分子シャペロンの一つであるシャペロニンの部分断片と目的タンパク質(目的ポリペプチド)とを融合させることにより、目的タンパク質の収量を増大させる方法が開示されている。さらに、シグナルペプチドを目的タンパク質に付与し、例えば大腸菌のペリプラズム領域に分泌発現させれば、通常は封入体となる目的タンパク質が可溶性タンパク質として発現できることが開示されている。しかしながら、ペリプラズム領域への発現する場合は発現産物の収量が少ないだけでなく、可溶性効率自体も不十分である。

[0008] ペプチジルプロリル シストランス イソメラーゼ (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase。以下、「PPIase」と称する。)は、タンパク質の折り畳みに関与する折り畳み因子の1つであり、細胞内で折り畳み途上のタンパク質中のアミノ酸のうち、プロリン残基のN末端側ペプチド結合のシストランス異性化反応を触媒する活性(PPIase活性)を有するものである。そして、至適生育温度が55℃以上である好熱性古細菌又は超好熱性古細菌に由来するFKBP(FK506 Binding Protein)型PPIaseは、PPIase活性のみならず、分子シャペロン活性を有することが知られている。ここで、「分子シャペロン活性」とは、タンパク質の不可逆的凝集を抑制すると同時に、変性タンパク質の再折り畳みを促進させる活性と定義される。そして、この分子シャペロン活性を有するFKBP型PPIaseを用いて、正常型のタンパク質を得る方法が提案されている(非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5)。この好熱性古細菌又は超好熱性古細菌由来FKBP型PPIaseが有する分子シャペロン活性は、シャペロニンが有する分子シャペロン活性と異なり、その活性発現にATP等の高エネルギー物質を必要としない点で優れている。

[0009] 特許文献1:特開平9-220092号公報

特許文献2:国際公開00/075346号パンフレット

非特許文献1:プルックサン(Pluckthun)、バイオテクノロジー(Biotechnology)、第9巻、第545頁一、1991年

非特許文献2:古谷(Furutani)、バイオケミストリー(Biochemistry)、第39巻、第4

53頁一、2000年

非特許文献3:井手野 (Ideno)、ユーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Eur. J. Biochem.)、第267巻、第3139頁一、2000年

非特許文献4:井手野 (Ideno)、バイオケミカル・ジャーナル (Biochem. J.)、第357巻、第465頁一、2001年

非特許文献5:井手野 (Ideno)、アプライド・エンバイロンメンタル・マイクロバイオロジー (Appl. Env. Microbiol.)、第68巻、第464頁一、2002年

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] 通常、タンパク質を取り扱う際には、熱失活を避けるために低温から常温域、具体的には4〜37℃程度の温度域で取り扱うことが多い。また、大腸菌や酵母等の宿主を用いて組換えタンパク質を生産する場合は、宿主の至適生育温度である25〜37℃で生産する人が多い。しかし、上記した好熱性古細菌又は超好熱性古細菌の至適生育温度は55℃以上であり、それらの古細菌由来のFKBP型PPIaseの最大活性を示す温度も55℃以上と考えられる。よって、これらのFKBP型PPIaseは低温から常温域での活性が高くなく、試験管内又は宿主内で目的タンパク質を正しく折り畳むには不適である。一方、常温性の古細菌としては高度好塩菌が知られている。すなわち、高度好塩菌は37℃前後に至適生育温度域を有しているため、同菌由来のFKBP型PPIaseは低温から常温域での高い活性が期待される。しかしながら、高度好塩菌の菌体内は1〜3M程度という高い塩濃度に保たれているため、その高度好塩菌が有するタンパク質も高い塩濃度下でのみ活性を示すものが多く、通常の生化学的な環境下でも十分な活性を示すかは不明である。他方、他の常温性の古細菌としては、メタン生成能を有するメタン生成菌が知られている。しかし、メタン生成菌由来のFKBP型PPIaseは未だ単離されておらず、その作用や物理化学的性質についても定かではない。

[0011] 本発明の目的は、低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下でも十分な活性を示すFKBP型PPIaseを提供することであり、さらに、該FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができる発現ベクター、該発現ベクター

を含有する形質転換体、FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質の製造方法、該FKBP型PPIaseを利用した目的タンパク質の製造方法、該PPIaseの精製方法、及び該融合タンパク質の精製方法を提供することも本発明の目的である。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、鋭意検討の結果、メタン生成菌に属する常温性古細菌由来のFKBP型PPIaseを単離し、該FKBP型PPIaseが分子シャペロン活性を有しており、低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下でも十分な活性を示すことを見出した。さらに、該FKBP型PPIaseの中でも特定のアミノ酸配列を有するもの、また、その中でも特に、特定のアミノ酸配列を欠失または元来保有しないものは、極めて高い分子シャペロン活性を有することを見いだした。さらに、該FKBP型PPIaseを目的タンパク質に作用させることによって、極めて高効率で目的タンパク質を正しく折り畳むことができることを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

- [0013] (1) メタン生成菌に属する常温性古細菌に由来することを特徴とするFKBP型PPIase、
- (2) 上記常温性古細菌は、Methanosarcina属古細菌であることを特徴とする(1)記載のFKBP型PPIase、
- (3) ショートタイプFKBP型PPIaseであることを特徴とする(1)又は(2)記載のFKBP型PPIase、
- (4) 配列番号1、2又は3で表されるアミノ酸配列からなるモチーフを、その一部に含むアミノ酸配列を有することを特徴とする(1)、(2)又は(3)記載のFKBP型PPIase、
- (5) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるモチーフを、そのN末端領域に含まないアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項(1)、(2)、(3)又は(4)記載のPPIase、
- (6) 配列番号6に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするFKBP型PPIase、
- (7) 配列番号8に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするFKBP型PPIase、
- (8) 配列番号10に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするFKBP型PPIase、
- (9) ロングタイプFKBP型PPIaseであることを特徴とする(1)又は(2)記載のFKBP

型PPIase、

(10) 配列番号18に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするFKBP型PPIase

、

(11) (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)又は(10)記載のFKBP型PPIaseと実質的に同一のアミノ酸配列を有し、かつ、実質的に同一の活性を有することを特徴とするFKBP型PPIase。

[0014] さらに、

(12) (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)又は(11)記載のFKBP型PPIaseをコードする第1コード領域と、少なくとも1つの制限酵素サイトを有し、前記制限酵素サイトに目的タンパク質をコードする第2コード領域を挿入することによりFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができることを特徴とする発現ベクター、

(13) 上記制限酵素サイトは、前記第1コード領域の下流に位置することを特徴とする(12)記載の発現ベクター、

(14) 上記第1コード領域と前記制限酵素サイトの間に、ペプチドリンカーをコードする塩基配列を有することを特徴とする(12)又は(13)記載の発現ベクター、

(15) 上記ペプチドリンカーは、プロテアーゼ消化アミノ酸配列を含むことを特徴とする(14)記載の発現ベクター、

(16) (12)、(13)、(14)又は(15)に記載の発現ベクターの制限酵素サイトに、目的タンパク質をコードする第2コード領域が組み込まれていることを特徴とする発現ベクター、

(17) 上記第2コード領域は、抗体又は抗体の部分断片をコードする遺伝子であることを特徴とする(16)記載の発現ベクター、

(18) 上記第2コード領域は、細胞内受容体タンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする(16)記載の発現ベクター、

(19) (16)、(17)又は(18)記載の発現ベクターを含有することを特徴とする形質転換体、

(20) 宿主が大腸菌であることを特徴とする(19)記載の形質転換体。

[0015] さらに、

(21) (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)又は(11)記載のFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質、

(22) 上記FKBP型PPIaseと前記目的タンパク質との間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列を有することを特徴とする(21)記載の融合タンパク質、

(23) (16)記載の発現ベクターに組み込まれた第1コード領域及び第2コード領域を転写及び翻訳させ、FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を合成することを特徴とする融合タンパク質の製造方法、

(24) (16)記載の発現ベクターに組み込まれた第1コード領域及び第2コード領域を転写及び翻訳させ、FKBP型PPIaseと目的タンパク質の融合タンパク質を合成し、次いで、該融合タンパク質から目的タンパク質を切り出すことを特徴とする目的タンパク質の製造方法、

(25) 前記発現ベクターは第1コード領域と第2コード領域の間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、第1コード領域と、プロテアーゼ消化アミノ酸配列をコードする塩基配列と、第2コード領域とを転写及び翻訳させ、FKBP型PPIaseと目的タンパク質との間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列を有する融合タンパク質を合成し、該融合タンパク質に該プロテアーゼを作用させることにより目的タンパク質を切り出すことを特徴とする(24)に記載の目的タンパク質の製造方法、

(26) (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)又は(11)記載のFKBP型PPIaseをコードする遺伝子と目的タンパク質をコードする遺伝子を同一宿主内で共発現させることにより、宿主内で目的タンパク質にFKBP型PPIaseを作用させ、目的タンパク質を可溶化し、宿主の可溶画分から目的タンパク質を採取することを特徴とする目的タンパク質の製造方法、

(27) (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)又は(11)記載のFKBP型PPIaseを含む試料を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供することにより、該FKBP型PPIase以外の成分を除去することを特徴とするFKBP型PPIaseの精製方法、

(28) (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)又は(11)記載のFK

BP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を含む試料を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供することにより、該融合タンパク質以外の成分を除去することを特徴とする融合タンパク質の精製方法。

発明の効果

- [0016] 本発明のFKBP型PPIaseによれば、低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下でも効率的に目的タンパク質を折り畳むことができる。
- [0017] 本発明の発現ベクターによれば、FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができ、目的タンパク質は低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下でも効率的に折り畳まれる。
- [0018] 本発明の形質転換体によれば、低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下でも十分な活性を示すFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を生産することができる。
- [0019] 本発明の融合タンパク質によれば、目的タンパク質は低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下でも効率的に折り畳まれる。
- [0020] 本発明の融合タンパク質の製造方法によれば、本発明の融合タンパク質を効率よく製造することができる。
- [0021] 本発明の目的タンパク質の製造方法によれば、正しく折り畳まれた目的タンパク質を高効率で製造することができる。
- [0022] 本発明のFKBP型PPIaseの精製方法によれば、低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下で高い活性を示すFKBP型PPIaseを簡便に精製することができる。
- [0023] 本発明の融合タンパク質の精製方法によれば、目的タンパク質の製造に有用な融合タンパク質を簡便に精製することができる。

図面の簡単な説明

- [0024] [図1]メタン生成菌に属する古細菌由来の9種のショートタイプFKBP型PPIaseのアミノ酸配列を並べて比較した図である。
- [図2]実施例1で構築した発現ベクターpMm18F2の構成を表す模式図である。
- [図3]実施例5でMaFKBP17.8を製造した結果を表すSDS-PAGE/CBBのゲル

ルの写真である。

[図4]実施例8でMaFKBP28. 0を製造した結果を表すSDS-PAGE/CBBのゲルの写真である。

[図5]実施例9で行ったMaFKBP17. 8の分子シャペロン活性の評価結果を表すグラフである。

[図6]実施例10におけるSDS-PAGE/CBBのゲルの写真であり、図6(a)は融合タンパク質を製造した結果を表し、図6(b)はロダネーゼを製造した結果を表し、図6(c)は比較例の結果を表す。

[図7]実施例15、16及び17におけるSDS-PAGE/CBBのゲルの写真であり、図7(a)は実施例15で融合タンパク質を製造した結果を表し、図7(b)は実施例16で融合タンパク質を製造した結果を表し、図7(c)は実施例17で融合タンパク質を製造した結果を表す。

発明を実施するための最良の形態

[0025] 以下、本発明を実施するための最良の形態について、詳しく説明する。

[0026] 本発明のFKBP型PPIaseの一つは、メタン生成菌に属する常温性古細菌に由来するものである。ここで、「常温性古細菌」とは常温菌(中温菌ともいう)のうち古細菌に属する生物種を指し、Madiganらの分類法によると、一般に、至適生育温度が20～45℃である古細菌を指す(Madigan, M. T. et al., 1997, "Block Biology of Microorganism" 8th ed., Prentice Hall, New York)。また、この場合の「至適生育温度」とは、その微生物の増殖速度が最も早められる温度を指す。メタン生成菌に属する常温性古細菌としては、特に限定されず、例えば、*Methanosarcina*属、*Methanobacterium*属、*Methanosphaera*属、*Methanococcus*属、*Methanocaldococcus*属、及び*Methanoignis*属、並びに*Methanomicrobiales*目に属する古細菌が挙げられる。特に、*Methanosarcina*属に属する古細菌、とりわけ、*Methanosarcina barkeri*、*Methanosarcina mazei*、及び*Methanosarcina acetivorans*由来のFKBP型PPIaseは、低温から常温域でかつ通常の生化学的な環境下において、PPIase活性及び／又は分子シャペロン活性が高く、好適である。なお、本発明のFKBP型PPIaseのタンパク質折り畳み作用は、その分子シャペロ

ン活性によるところが大きいと考えられるが、PPIase活性も寄与している。

[0027] 一般に、FKBP型PPIaseは、分子量が16～18kDa程度のショートタイプFKBP型PPIaseと、分子量が26～33kDa程度のロングタイプFKBP型PPIaseとに大別される。そして、FKBP型PPIaseは、これまでの解析の結果、ショートタイプとロングタイプのいずれもが分子シャペロン活性を有するが、PPIase活性については、ショートタイプFKBP型PPIaseの方がより高いことが知られている。さらに、古細菌由来FKBP型PPIaseは、ショートタイプ及びロングタイプのいずれも、PPIase活性及びFK506結合活性を担うFKBPドメインを有し、FKBPドメイン中に古細菌FKBP型PPIaseに特徴的なバルジ領域及びフラップ領域の2つの挿入配列を有していることが特徴である (Maruyama T, Suzuki R, Furutani M., Front Biosci. (2004) 9:1680-720)。そして、ロングタイプ古細菌由来FKBP型PPIaseは、上記2つの挿入配列を有するFKBPドメインのC末端側に、約100～150アミノ酸からなるC末端ドメインを有する。本発明のFKBP型PPIaseは、ショートタイプ、ロングタイプのいずれでもよい。

[0028] また、本発明のFKBP型PPIaseでショートタイプのものは、配列番号1、2又は3で表されるアミノ酸配列 (以下、「コンセンサス配列B」と称する。) からなるモチーフを、その一部に含むアミノ酸配列を有することが好ましい。なお、配列番号1、2又は3で表されるアミノ酸配列中のXaaは任意のアミノ酸で、それらは互いに異なるアミノ酸でもよいし、同じアミノ酸でもよい。コンセンサス配列Bは、配列番号1、2又は3の他に、下記一般式(I)で表すこともできる。

[化1]



(Asp はアスパラギン酸、Asn はアスパラギン、His はヒスチジン、Leu はロイシン、Ala はアラニン、Gly はグリシン、A は任意のアミノ酸、B は任意のアミノ酸、X は3～5個の任意のアミノ酸からなるペプチド)

[0029] さらに、本発明のFKBP型PPIaseでショートタイプのものは、配列番号4で表されるアミノ酸配列 (以下、「コンセンサス配列A」と称する。) からなるモチーフを、そのN末

端領域に含まないことが好ましい。ここで、N末端領域とは、そのタンパク質のN末端から略40アミノ酸残基までの領域をいう。

[0030] 本発明者らは、メタン生成菌に属する常温性古細菌由来の9種のショートタイプFKBP型PPIaseのアミノ酸配列(遺伝子の塩基配列からの推定)を比較し、上記したコンセンサス配列の有無により3つのグループに分類されることを見出した。すなわち、グループ1のショートタイプFKBP型PPIaseは、コンセンサス配列AをそのN末端領域に含まないが、コンセンサス配列Bをそのアミノ酸配列中に含むものである。また、グループ2ショートタイプFKBP型PPIaseは、コンセンサス配列AそのN末端領域に含まないが、コンセンサス配列BのPheが他のアミノ酸に置き換わったアミノ酸配列をそのアミノ酸配列中に含むものである。また、グループ3のショートタイプFKBP型PPIaseは、コンセンサス配列AをそのN末端領域に含み、かつコンセンサス配列Bもそのアミノ酸配列中に含むものである。これらのグループ1、グループ2及びグループ3のFKBP型PPIaseのアミノ酸配列を並べて比較した図を図1に示す。なお、図1においてはアミノ酸配列を1文字表記で表している。

[0031] 図1において、MaFKBP17. 8はMethanosarcina acetivorans由来のグループ1型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号8)、MmFKBP18. 0はMethanosarcina mazei由来のグループ1型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号6)、MbFKBP19はMethanosarcina barkeri由来のグループ1型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号10)である。また、MbFKBP21はM. barkeri由来のグループ3型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号11)、MmFKBP17. 9はM. mazei由来のグループ3型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号12)、MaFKBP19はM. acetivorans由来のグループ3型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号13)である。また、MaFKBP18. 2はM. acetivorans由来のグループ2型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号14)、MmFKBP18. 2はM. mazei由来のグループ2型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号15)、MbFKBP18はM. barkeri由来のグループ2型ショートタイプFKBP型PPIase(配列番号16)である。

[0032] 各コンセンサス配列についてさらに詳しく説明する。まずコンセンサス配列Bは、図1で囲んで示した各アミノ酸配列のC末端側の配列、「D**NH**LAG****F」(

*は任意のアミノ酸)に対応するアミノ酸配列である。このコンセンサス配列Bを一般化すると、Asp-A-Asn-His-B-Leu-Ala-Gly-X-Phe(Aは任意のアミノ酸、Bは任意のアミノ酸、Xは3〜5個の任意のアミノ酸からなるペプチド)と表現することができ、これは、配列番号1、2又は3で表されるアミノ酸配列と同じである。このコンセンサス配列Bは、古細菌由来FKBP型PPIaseに見られる特徴的なモチーフである。このコンセンサス配列Bの中で重要なアミノ酸はC末端のPheであり、前述の通り、本箇所のアミノ酸の種類によってショートタイプFKBP型PPIaseを、グループ1とグループ2に分類することができる。なお、コンセンサス配列BのXは、3〜5個の任意のアミノ酸からなるペプチドであるが、図1の例のように4個のアミノ酸からなる場合が多い。

[0033] 一方、コンセンサス配列Aは、図1で囲んで示したグループ3のN末端側の配列、「GSGC」に対応するアミノ酸配列である。これは、配列番号4で表されるアミノ酸配列 Gly-Ser-Gly-Cysである。このコンセンサス配列Aは、一部の常温性古細菌由来FKBP型PPIaseのN末端に近い領域に見られるモチーフであり、前述の通り、本モチーフの有無によってショートタイプFKBP型PPIaseをグループ3とその他のグループに分類することができる。すなわち、本モチーフを有するショートタイプFKBP型PPIaseは、グループ3に属する。本発明のFKBP型PPIaseにおいては、コンセンサス配列Bを有するグループ1が特に好ましく、さらに、コンセンサス配列BをN末端領域に有さないことが好ましい。なお、グループ3のショートタイプFKBP型PPIaseであっても、そのN末端領域を改変又は欠失させることによってコンセンサス配列Aを除去すれば、グループ1のショートタイプFKBP型PPIaseに変換することができる。

[0034] これらのショートタイプFKBP型PPIaseのなかでも、グループ1のFKBP型PPIaseは、グループ2又はグループ3のFKBP型PPIaseに比べて、その分子シャペロン活性が高い。このようなグループ1のFKBP型PPIaseは、例えば、上述のM. mazei、M. acetivorans、M. barkeri等のMethanosarcina属細菌に属する古細菌が有している。ここで、M. mazeiに由来するグループ1型ショートタイプFKBP型PPIaseをコードする遺伝子の塩基配列と推定されるアミノ酸配列を配列番号5に、アミノ酸配列のみを配列番号6に示す。同様に、M. acetivoransに由来するグループ1型ショートタイプFKBP型PPIaseをコードする遺伝子の塩基配列と推定されるアミノ

酸配列を配列番号7に、アミノ酸配列のみを配列番号8に示す。また同様に、*M. barkeri*に由来するグループ1型ショートタイプFKBP型PPIaseをコードする遺伝子の塩基配列と推定されるアミノ酸配列を配列番号9に、アミノ酸配列のみを配列番号10に示す。

[0035] 一方、本発明のFKBP型PPIaseのうち、ロングタイプの例として、*Methanosarcina acetivorans*に由来するロングタイプFKBP型PPIaseをコードする遺伝子の塩基配列と推定されるアミノ酸配列を配列番号17に、アミノ酸配列のみを配列番号18に示す。

[0036] 本発明のFKBP型PPIaseと実質的に同一のアミノ酸配列を有し、かつ、実質的に同一の活性を有するFKBP型PPIaseもまた、本発明の1つである。ここで、「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、アミノ酸配列中の1又は2個以上(好ましくは1〜10個程度、より好ましくは1〜5個程度)のアミノ酸が欠失したもの、アミノ酸配列に1又は2個以上(好ましくは1〜20個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは1〜5個程度)のアミノ酸が付加したもの、アミノ酸配列中の1又は2個以上(好ましくは1〜10個程度、より好ましくは1〜5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたもの等を意味する。また、実質的に同一のアミノ酸配列を有するとは、相同性が少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上であることを意味する。なお、アミノ酸配列の相同性は、例えば、CulustalW等の市販の多重整列プログラムを用いて計算することができる。

[0037] また、「実質的に同一の活性」とは、分子シャペロン活性及び／又はPPIase活性が実質的に同一であることを指す。なお、分子シャペロン活性の評価は、例えば、ロダネーゼ、クエン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等をモデル酵素とし、これを6M塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤で変性処理後、検定対象物質を含む緩衝液で変性剤を希釈した際に開始する変性タンパク質の再生率や、変性タンパク質の凝集の抑制率を測定することにより行うことができる(河田、バイオサイエンスとインダストリー 56, 593-、1998年; Horowitz, Methods Mol. Biol. 40, 361-、1995年; Taguchi, J. Biol. Chem. 269, 8529-、19

94年)。また、PPIase活性の評価は、例えば、キモトリプシンカップリング法(J. Bacteriol. 1998, 180(2):388-394)により行なうことができる。

[0038] 本発明の発現ベクターは、上記した本発明のFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を発現できるものである。すなわち、本発明の発現ベクターは、本発明のFKBP型PPIaseをコードする第1コード領域と、少なくとも1つの制限酵素サイトを有するものであり、この制限酵素サイトに目的タンパク質をコードする第2コード領域を挿入することによりFKBP型PPIaseと目的タンパク質の融合タンパク質を発現することができる。ここで、融合タンパク質が発現できるということは、換言すれば、制限酵素サイトは、第1コード領域と同じ読枠内に位置しているということである。さらに換言すれば、該制限酵素サイトに第2コード領域を挿入したときに、第1コード領域と第2コード領域の読枠が一致しており、かつ第1コード領域と第2コード領域の間に終止コドンが存在しないということである。なお、制限酵素サイトの位置は第1コード領域の上流でもよいし下流でもよい。制限酵素サイトが第1コード領域の下流にあるときは、第1コード領域はプロモーターに有効に連結していることが必要である。そのような発現ベクターによれば、該プロモーターによって第1コード領域から転写が開始され、N末端側がFKBP型PPIaseでC末端側が目的タンパク質である融合タンパク質を発現することができる。

[0039] 上記プロモーターとしては、用いる発現系に応じて適宜選択すればよく、宿主内で発現させる場合は、その宿主に適合したものをを用いればよい。宿主が大腸菌であれば、例えば、Placプロモーター、Ptacプロモーター、xylAプロモーター、AraBプロモーター、lambdaプロモーター、T7プロモーター等を用いることができる。ほ乳細胞系によって発現させる場合は、ほ乳類細胞のゲノムから単離された、例えばマウスメタロチオネインプロモーター等のプロモーターや、これらの細胞で成長するウイルスから単離された、例えばバキュロウイルスプロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター等のプロモーターを用いることができる。

[0040] 本発明の発現ベクターにおいては、さらに、第1コード領域と前記制限酵素サイトの間にペプチドリinkerとなる塩基配列を有してもよい。そのようなペプチドリinkerの代表例はプロテアーゼ消化アミノ酸配列である。すなわち、本発明の発現ベクターに

においては、第1コード領域と前記制限酵素サイトとの間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列をコードする塩基配列を有することが好ましい。該プロテアーゼ消化アミノ酸配列をコードする塩基配列は、第1コード領域及び第2コード領域と同じ読枠内で転写・翻訳され、プロテアーゼ消化アミノ酸配列となる。すなわち、本実施形態の発現ベクターによれば、FKBP型PPIaseと目的タンパク質とがプロテアーゼ消化アミノ酸配列を介して連結された融合タンパク質を発現することができる。そして、該融合タンパク質に対応のプロテアーゼを作用させることにより、目的タンパク質を切り出すことができる。

[0041] 上記プロテアーゼとしては特に限定されず、例えば、トロンビン、ファクターXa、プレシジョンプロテアーゼ、エンテロキナーゼ等が挙げられる。これらのプロテアーゼとしては、例えば、市販されているものを用いることができる。また、プロテアーゼ認識アミノ酸配列以外のペプチドリンカーとしては、例えば、インティンの自己切断アミノ酸配列が挙げられる。すなわち、インティンの自己タンパク質スプライシング機能を利用して融合タンパク質から目的タンパク質を切り出すことができる。なお、ペプチドリンカーをコードする塩基配列の長さは特に限定されないが、15〜90塩基程度であることが好ましく、翻訳されてグリシンやセリン等の中性アミノ酸となる塩基配列を多く含むことが好ましい。

[0042] 本発明の発現ベクターは、さらに、他の従来公知の塩基配列を含んでいてもよい。上記他の従来公知の塩基配列としては特に限定されず、例えば、発現産物の安定性を付与する安定性リーダー配列、発現産物の分泌を付与するシグナル配列、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等の形質転換された宿主において表現型選択を付与することが可能なマーキング配列等が挙げられる。

[0043] 上記した発現ベクターの制限酵素サイトに、目的タンパク質をコードする第2コード領域がすでに組み込まれている発現ベクターも、本発明の1つである。このような発現ベクターによれば、第2コード領域を組み込む操作が不要であり、そのまま転写・翻訳させることによりFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を製造することができる。第2コード領域にコードされる目的タンパク質としては、例えば、抗体

又は抗体の部分断片が挙げられる。抗体の部分断片としては、Fab、Single chain Fv(scFv)、Fc、抗体の各ドメインの2個以上の断片がペプチド結合で連結したポリペプチド等が挙げられる。また、上記抗体の由来動物やサブクラスは何でもよい。このように、抗体又は抗体の部分断片をコードする第2コード領域を含むベクターを使用すると、大腸菌等の宿主内で発現させても封入体とならず、正しく折り畳まれた抗体を得ることができる。その結果、従来のように動物を用いて抗体を作らせる必要がなく、より簡便かつ大量に抗体を得ることができる。なお、抗体をコードする遺伝子は、例えば、ハイブリドーマから調製することができる。そして、単一のハイブリドーマから得られる抗体をコードする遺伝子は単一であるので、得られる抗体はモノクローナルな抗体である。一方、ポリクローナルな抗体を取得する場合は、例えば、複数種のハイブリドーマからそれぞれ抗体をコードする遺伝子を取得し、それらの遺伝子を別々のベクターに組み込み、別々の形質転換体を作製し、それらの形質転換体を混合培養すればよい。

- [0044] 第2コード領域にコードされる目的タンパク質の他の例としては、細胞内受容体タンパク質が挙げられる。生理活性物質を受容する細胞内受容体タンパク質は、ほとんどが生体膜中に存在する。これらの細胞内受容体タンパク質は細胞外の様々な物質に選択的に応答し、細胞内に多彩なシグナルを伝達することから、その機能を解明することが創薬に直接繋がるとして非常に注目されている。これらの細胞内受容体タンパク質は構造的によく保存されたファミリーを形成しており、大きく分けて、イオンチャネル内在型、チロシンカイネース型、及びGタンパク質共役型の3つに分類される。
- [0045] イオンチャネル内在型は、リガンドが受容体に結合すると、受容体そのものに存在するイオンチャネルが開き、 Na^+ や Ca^{2+} 等を細胞内外のイオン勾配を利用して細胞内に移動させるタイプである。チロシンカイネース型は、リガンドの結合をリン酸化活性の上昇に転換させ、一連のカスケードを引き起こすことによりシグナルを増幅する。Gタンパク質共役型は、受容体自身はイオンチャネルや酵素活性を持たず、リガンドの結合による情報をGタンパク質を介して細胞内に伝達する。
- [0046] 細胞内受容体タンパク質を標的とした医薬品は数多く開発されているが、その多くがGタンパク質共役型受容体(GPCR)をターゲットとしている。したがって、GPCRの

内因性リガンドを特定し、さらにその機能及び構造を明らかにすることによって、迅速な医薬品開発が可能になることが期待できる。これらのリガンドスクリーニングや構造解析のための結晶化や重水素化のためにはGPCRの大量発現技術の開発が不可欠であるが、これまでGPCRの発現は大腸菌や酵母では不可能であるとされてきており、主にCHOやCOS-7、HEKのような動物培養細胞で発現した微量なサンプルを用いて様々な分析を行っているのが現状であった。しかし、本発明の発現ベクターによれば、細胞内受容体タンパク質についても、大腸菌等を用いて組換え型タンパク質を安価に、かつ、大量に製造することができる。

- [0047] 本発明の形質転換体は、上記した発現ベクターのうち、第2コード領域がすでに組み込まれている発現ベクターを含有するものである。本発明の形質転換体を培養することにより、FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を製造することができる。本発明の形質転換体の元となる宿主は、本発明の発現ベクターの特性と適合するものであれば特に制限はなく、例えば、細菌等の原核生物、酵母、真菌、植物、昆虫細胞、ほ乳類細胞等が挙げられる。ここで、宿主が発現ベクターの特性と適合するとは、宿主内においてその発現ベクターが複製可能であり、かつ第1コード領域と第2コード領域を転写・翻訳できるということである。特に、転写が正常に行われるためには、発現ベクター上のプロモーターが正常に働く宿主を選択することが必要である。
- [0048] 上記宿主のうち、大腸菌はその取り扱いが容易であり、かつ宿主ベクター系も充実しているので特に好適である。大腸菌を宿主として用いる場合、発現ベクターから転写・翻訳される融合タンパク質は、細胞質に発現させてもよいし、ペリプラズム領域に発現させてもよい。ペリプラズム領域に融合タンパク質を発現させる場合は、融合タンパク質の5'末端にシグナル配列が付加されるように発現ベクターを構築し、大腸菌に導入すればよい。
- [0049] 本発明の形質転換体を作成する際の、発現ベクターを宿主に導入する方法は、公知の種々の方法を用いることができ、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気穿孔、リポソーム融合、核注入、ウイルス又はファージ感染等が挙げられる。
- [0050] なお、本発明の発現ベクターは、宿主に導入する以外に、バクテリア又は真核生物

抽出液等を用いた無細胞翻訳系 (Spirin, A. S., 1991, Science, 11, 2656-2664; Falcone, D. et al., 1991, Mol. Cell. Biol., 11, 2656-2664) にて発現させることも可能である。無細胞翻訳系は、目的タンパク質が宿主に毒性を示すものである場合等に有効である。

[0051] 本発明の融合タンパク質の主な実施形態は、メタン生成菌に属する常温性古細菌由来のFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質である。本発明の融合タンパク質によれば、目的タンパク質が単独で発現すると正しく折り畳まれずに異常型タンパク質となってしまう場合でも、FKBP型PPIaseとの融合タンパク質として発現させることで、目的タンパク質を正しく折り畳まれた正常型タンパク質として発現することができる。その結果、正常型の目的タンパク質の生産性を飛躍的に向上させることができる。なお、目的タンパク質は適宜の方法で融合タンパク質から切り出すことができる。例えば、FKBP型PPIaseと目的タンパク質の間にプロテアーゼ認識アミノ酸配列を挿入しておけば、融合タンパク質に該プロテアーゼを作用させることにより、目的タンパク質を切り出し、単離することができる。なお、本発明の融合タンパク質は、例えば、上記した発現ベクター上の第1コード領域と第2コード領域を転写・翻訳することにより製造することができる。さらに、第1コード領域と第2コード領域の間にプロテアーゼ認識アミノ酸配列をコードする塩基配列を挿入しておけば、FKBP型PPIaseと目的タンパク質の間にプロテアーゼ認識アミノ酸配列を有する融合タンパク質を製造することができる。

[0052] 本発明の目的タンパク質の製造方法は、メタン生成菌に属する常温性古細菌由来のFKBP型PPIaseの作用を利用して、正しく折り畳まれた正常型の目的タンパク質を製造するものである。この際、該FKBP型PPIaseを目的タンパク質に作用させる態様は主に2つある。1つの態様は、上記したように、目的タンパク質をFKBP型PPIaseとの融合タンパク質として発現させる、融合発現法である。融合発現法の場合は、目的タンパク質を切り出す工程が必要である。もう1つの態様は、FKBP型PPIaseと目的タンパク質をそれぞれ単独に同時に発現させる、共発現法である。共発現法によれば、目的タンパク質を切り出す必要がなく、製造工程を減らすことができる。なお、宿主を用いた共発現法の場合は、FKBP型PPIaseの遺伝子と目的タンパク質の

遺伝子は、同じ発現ベクター上に存在してもよく、別々の発現ベクターに組み込まれていてもよい。同じ発現ベクター上に存在する場合は、例えば、それぞれの遺伝子が別々のプロモーター下流に組み込めばよい。さらに、FKBP型PPIaseの遺伝子を宿主のゲノム上に、目的タンパク質の遺伝子を発現ベクター上に組み込む構成も可能である。

[0053] 本発明のFKBP型PPIase及び融合タンパク質は、タンパク質の精製に一般的に用いられている手法、すなわち、塩析、膜分離、各種クロマトグラフィー等を組み合わせることにより精製することができる。特に、本発明のFKBP型PPIaseの分子表面が疎水性アミノ酸に富んでいることを利用し、疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いることにより、本発明のFKBP型PPIase及び融合タンパク質を高純度に精製することができる。例えば、樹脂等に固定化された疎水基を介してFKBP型PPIase又は融合タンパク質を樹脂に吸着させ、FKBP型PPIase又は融合タンパク質が溶出されないような条件で樹脂を洗浄して不純物となる成分を除去することができる。なお、疎水基の例としては、C4〜C20程度のアルキル基、フェニル基等が挙げられる。また、精製に供するためのFKBP型PPIase及び融合タンパク質を含む試料は、例えば、それらの遺伝子を含有する形質転換体の培養物から調製することができる。

[0054] また、本発明のFKBP型PPIase及び融合タンパク質は、FKBP型PPIaseとFK506との親和性を利用して精製することもできる。すなわち、FK506やラパマイシン、その類縁化合物を担持させた担体を調製して、該担体にFKBP型PPIase又は融合タンパク質を含む試料を接触させ、担体上にFKBP型PPIase又は融合タンパク質を捕捉することができる。その後、適宜の方法で担体からFKBP型PPIase又は融合タンパク質を回収すればよい。

[0055] また、ヒスチジン6残基程度からなるヒスチジントグをあらかじめ、本発明のFKBP型PPIase又は融合タンパク質の末端に導入しておくことにより、それらの精製を容易にすることができる。すなわち、ヒスチジントグを末端に有するFKBP型PPIase又は融合タンパク質は、ニッケル等の金属をキレートした担体上に、ヒスチジントグを介して結合する。具体的には、ニッケル等の金属をキレートした担体にFKBP型PPIase又は融合タンパク質を含む試料を接触させ、該担体上にヒスチジントグを介してFKBP

型PPIase又は融合タンパク質を捕捉することができる。その後、イミダゾール等で溶出して担体からFKBP型PPIase又は融合タンパク質を回収すればよい。このようなタグを用いる方法としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ又はその一部分をタグとし、グルタチオン樹脂によるアフィニティークロマトグラフィーにより精製する方法や、マルトース結合タンパク質又はその一部をタグとし、マルトース樹脂により精製する方法等がある。なお、これらのタグは、PPIase又は融合タンパク質のN末端側及びC末端側のいずれに導入してもよく、双方に導入してもよい。

- [0056] 以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

実施例 1

- [0057] 本実施例では、メタン生成菌に属する古細菌*Methanosarcina mazei*由来ショートタイプFKBP型PPIase (MmFKBP18. 0)と目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。なお、MmFKBP18. 0はグループ1型のショートタイプFKBP型PPIaseである。

- [0058] *Methanosarcina mazei* Goel (DSM3647)の菌懸濁液から菌ペレットを回収し、フェノール/クロロホルム処理、及び、エタノール沈殿法により、ゲノムDNAを回収した。一方、配列番号5に示される公知のMmFKBP18. 0遺伝子の塩基配列を参考にして、PCR用のプライマーとして配列番号19に示されるMm18-F1プライマー及び配列番号20に示されるMm18-R1プライマーを合成した。次に、得られたゲノムDNAを鋳型とし、Mm18-F1プライマー及びMm18-R1プライマーをプライマー対としてPCRを行い、MmFKBP18. 0遺伝子を増幅した。増幅されたDNA断片の塩基配列を確認したところ、公知のMmFKBP18. 0遺伝子の塩基配列と一致した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、Mm18-F1の5'末端に由来するNcoIサイト及びMm18-R1の3'末端に由来するSpeIサイトが導入された。

- [0059] 一方、配列番号39に示されるリンカーThrom-F2及びその相補鎖であるリンカーThrom-R2を合成した。なお、リンカーThrom-F2は、5'側にSpeIサイトを、3'側にEcoRIサイトを有し、内部には目的タンパク質の遺伝子を導入するためのBamHIサイト及びNdeIサイトを有している。さらに、融合タンパク質から目的タンパク質をトロ

ンビンにより切り出せるように、BamHIサイトの上流に、翻訳されてトロンビン認識アミノ酸配列となる塩基配列を有している(図2)。次に、リンカーThrom-F2とリンカーThrom-R2をアニーリングさせ、2本鎖リンカーThromを調製した。

- [0060] MmFKBP18.0遺伝子を含む増幅DNA断片をNcoI/SpeIで、2本鎖リンカーThromをSpeI/EcoRIでそれぞれ処理し、あらかじめNcoI/EcoRIにて処理したpET21dプラスミドDNA(ノバジェン社製)に、MmFKBP18.0遺伝子-2本鎖リンカーの順になるよう挿入して、発現ベクターpMm18F2を構築した。発現ベクターpMm18F2の構成を図2に示す。すなわち、発現ベクターpMm18F2は、T7プロモーターの下流に、順に、第1コード領域となるMaFKBP18.0遺伝子、トロンビン認識アミノ酸配列をコードする塩基配列、BamHIサイト、及びNdeIサイトを有する。そして、BamHIサイト又はNdeIサイトに第2コード領域となる目的タンパク質をコードする遺伝子を挿入することにより、MmFKBP18.0と目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができる。また、発現される該融合タンパク質は、MmFKBP18.0と目的タンパク質の間にトロンビン消化アミノ酸配列を有する。

実施例 2

- [0061] 本実施例では、メタン生成菌に属する古細菌Methanosarcina barkeri由来ショートタイプFKBP型PPIase(MbFKBP19.0)と目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。なお、MbFKBP19.0はグループ1型のショートタイプFKBP型PPIaseである。
- [0062] Methanosarcina barkeri type strain (DSM800)の菌懸濁液から菌ペレットを回収し、実施例1と同様の操作でゲノムDNAを回収した。配列番号9に示される公知のMbFKBP19.0遺伝子の塩基配列を参考にして、PCR用のプライマーとして配列番号21に示されるMb19-F1プライマー及び配列番号22に示されるMb19-R1プライマーを合成した。次に、得られたゲノムDNAを鋳型とし、Mb19-F1プライマー及びMb19-R1プライマーをプライマー対としてPCRを行い、MbFKBP19.0遺伝子を増幅した。増幅されたDNA断片の塩基配列を確認したところ、公知のMbFKBP19.0遺伝子の塩基配列と一致した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、Mb19-F1の5'末端に由来するSphIサイト及びMb19-R1の3'末端に由来するS

peIサイトが導入された。次に、実施例1と同様にして、MbFKBP19.0遺伝子を含む増幅DNA断片と、2本鎖リンカーThromをpET21プラスミドDNAに挿入して、発現ベクターpMb19F2を構築した。すなわち、発現ベクターpMb19F2は、図2に示される発現ベクターpMm18F2の構成のうち、MmFKBP18.0遺伝子に代わってMbFKBP19.0遺伝子とした構成を有する。

実施例 3

[0063] 本実施例では、メタン生成菌に属する古細菌*Methanosarcina acetivorans*由来ショートタイプFKBP型PPIase (MaFKBP17.8)と目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。なお、MaFKBP17.8はグループ1型のショートタイプFKBP型PPIaseである。

[0064] *Methanosarcina acetivorans* C2A (DSM2834)の菌懸濁液から菌ペレットを回収し、実施例1と同様の操作でゲノムDNAを回収した。配列番号7に示される公知のMaFKBP17.8遺伝子の塩基配列を参考にして、PCR用のプライマーとして配列番号23に示されるMa17.8-F1プライマー及び配列番号24に示されるMa17.8-R1プライマーを合成した。次に、得られたゲノムDNAを鋳型とし、Ma17.8-F1プライマー及びMa17.8-R1プライマーをプライマー対としてPCRを行い、MaFKBP17.8遺伝子を増幅した。増幅されたDNA断片の塩基配列を確認したところ、公知のMaFKBP17.8遺伝子の塩基配列と一致した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、Ma17.8-F1の5'末端に由来するNcoIサイト及びMa17.8-R1の3'末端に由来するSpeIサイトが導入された。次に、実施例1と同様にして、MaFKBP17.8遺伝子を含む増幅DNA断片と、2本鎖リンカーThromをpET21プラスミドDNAに挿入して、発現ベクターpMa17F2を構築した。すなわち、発現ベクターpMa17F2は、図2に示される発現ベクターpMm18F2の構成のうち、MmFKBP18.0遺伝子に代わってMaFKBP17.8遺伝子とした構成を有する。

実施例 4

[0065] 本実施例では、*Methanosarcina acetivorans*由来ロングタイプFKBP型PPIase (MaFKBP28.0)と目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。

[0066] 1. 発現ベクターの構築

公知の配列番号17に示されるMaFKBP28. 0遺伝子の塩基配列を参考にして、PCR用のプライマーとして、配列番号37で示されるMa28-F1プライマー及び配列番号38で示されるMa28-R1プライマーを合成した。次に、実施例3で調製した*Methanosarcina acetivorans* C2A (DSM2834)のゲノムDNAを鋳型とし、Ma28-F1プライマー及びMa28-R1プライマーをプライマー対としてPCRを行い、MaFKBP28. 0遺伝子を増幅した。増幅されたDNA断片の塩基配列を確認したところ、公知のMaFKBP28. 0遺伝子の塩基配列と一致した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、Ma28-F1の5'末端に由来するNcoIサイト及びMa28-R1の3'末端に由来するSpeIサイトが導入された。次に、実施例1と同様にしてMaFKBP28. 0遺伝子及び2本鎖リンカーThromをpET21dプラスミドDNAのNcoI/EcoRIサイトに挿入して、発現ベクターpMa28F2を構築した。すなわち、発現ベクターpMa28F2は、図2に示される発現ベクターpMm18F2の構成のうち、MmFKBP18. 0遺伝子に代わってMaFKBP28. 0遺伝子とした構成を有する。

実施例 5

[0067] 本実施例では、MaFKBP17. 8を製造・精製した。

[0068] 1. MaFKBP17. 8の製造

実施例3で調製した発現ベクターpMa17F2を大腸菌BL21 (DE3)株 (Novagen社)に導入し、形質転換体を得た。2L容の三角フラスコに、100 μ g/mL アンピシリンを含む2×YT培地 (16g/L 酵母エキス、20g/L バクトトリプトン、5g/L NaCl、pH7. 5) 700mLを仕込み、得られた形質転換体を白金耳で2〜3回接種し、35°Cで24時間回転培養 (110rpm)した。培養終了後、培養液を遠心分離 (10000rpm×10分)し、菌体を回収した。得られた菌体を1mM EDTAを含む25mM HEPES緩衝液 (pH6. 8) 20mLに懸濁し、−20°Cにて凍結保存した。

[0069] 凍結保存した菌体懸濁液を融解し、超音波処理をして菌体を破碎した。菌体破碎液を遠心分離し、その上清 (可溶性画分)と沈殿部 (沈殿画分)に分離した。さらに沈殿画分を4% Triton X-100を含む25mM HEPES/1mM EDTA緩衝液 (pH 6. 8)に懸濁して30分間処理し、膜成分を可溶化した。懸濁液を遠心分離して、沈

殿を回収した。この操作を2回繰り返す、得られた沈殿を20mLの25mM HEPES / 1mM EDTA緩衝液 (pH6. 8) に懸濁して封入体画分を調製した。可溶性画分 10 μ g (5 μ L) と、5 μ L の封入体画分をそれぞれ SDS-PAGE 供し、クマシーブリアントブルー (CBB) にてゲルを染色した。図3にゲルの写真を示す。図3において、左側のレーンが可溶性画分であり、右側のレーンが沈殿画分である。すなわち、MaFKBP17. 8 に相当するバンド (矢印) は、可溶性画分のみに検出された。以上より、MaFKBP17. 8 は封入体になることなく、可溶状態で回収された。

[0070] 2. MaFKBP17. 8 の精製

得られた可溶性画分を下記条件の疎水性相互作用クロマトグラフィー、及び、ゲル濾過の順でカラム精製を繰り返すことにより、MaFKBP17. 8 をほぼ単一にまで精製した。なお、疎水性相互作用クロマトグラフィーの段階で、MaFKBP17. 8 はほとんど単一になっていた。

(a) 疎水性相互作用クロマトグラフィーの条件

使用カラム: HighTrap Phenyl FF

(容量5mL、アマシャムバイオサイエンス社製)

溶離液

A液: 10mMリン酸緩衝液 (pH6. 8) / 500mM硫酸アンモニウム含有

B液: 10mMリン酸緩衝液 (pH6. 8)

溶出条件: 0-50分: B液0-100%の直線グラジエント溶出

50-70分: B液100%のイソクラティック溶出

流速: 3mL / 分

カラム温度: 室温

(b) ゲル濾過条件

使用カラム: HiLoad 26 / 60 Superdex 200pg column

(26 mm \times 60cm、アマシャムバイオサイエンス社製)

溶離液: 100mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7. 0、0. 15M NaCl含有)

溶出条件: イソクラティック溶出

流速: 3mL / 分

カラム温度:室温

- [0071] 次に、精製したMaFKBP17. 8のPPIase活性を以下の手順で評価した。PPIase活性の測定はキモトリプシンカップリング法に準拠して行った。すなわち、2mLの100mMリン酸緩衝液(pH7. 8)に、MaFKBP17. 8を2. 5–25nM、PPIaseの基質ペプチドであるN-suc-Ala-Leu-Pro-Phe-p-ニトロアニリド(ペプチド研究所)を最終濃度 $2\mu\text{M}$ になるように加え、15°Cで2分間ブレインキュベートした。次いで、キモトリプシンを最終濃度 $2\mu\text{M}$ となるように添加し、遊離されるp-ニトロアニリドの吸光度を測定することでPPIase活性を評価した。その結果、MaFKBP17. 8のPPIase活性(kcat/Km)は $3.34\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ であった。この値は、以下の既報の好熱・超好熱菌由来FKBP型ショートタイプPPIaseのPPIase活性、すなわち、好熱性古細菌Methanococcus thermolithotrophicus由来PPIase(MtFKBP17)の $0.38\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ 、超好熱性古細菌Thermococcus sp. KS-1 PPIase(TcFKBP18)の $0.35\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ 、超好熱性古細菌Methanococcus jannaschii由来PPIase(MjFKBP18)の $0.92\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ の(Ideno et al., Gene 2002 Jun 12; 292(1–2):57–63)と比較して、有意に高かった。

実施例 6

- [0072] 本実施例では、MmFKBP18. 0を製造・精製した。

[0073] 1. MmFKBP18. 0の製造

実施例1で調製した発現ベクターpMm18F2を大腸菌BL21(DE3)株に導入し、形質転換体を得た。次に、実施例5と同様にして、形質転換体を培養し、菌体回収後、菌体懸濁液を–20°Cで凍結保存した。さらに、実施例5と同様にして菌体懸濁液を超音波処理し、その上清画分(可溶性画分)を得た。上清画分 $10\mu\text{g}$ をSDS-PAGEに供したところ、MmFKBP18. 0に相当する濃いバンドが検出され、MmFKBP18. 0が大量に可溶性画分に発現していることが確認された。

[0074] 2. MmFKBP18. 0の精製

得られた上清画分を実施例5と同様の疎水性相互作用クロマトグラフィー及びゲル濾過法、並びに、下記条件の陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、カラム精製を繰り返すことにより、MmFKBP18. 0をほぼ単一にまで精製した。

(c) 陰イオン交換クロマトグラフィー条件

使用カラム: DEAE Toyopearl column

(16mm×60cm; 東ソー社)

溶離液

A液: 25mM HEPES-KOH 緩液 (pH6.8)

B液: 0.5M NaClを含む25mM HEPES-KOH 緩液 (pH6.8)

溶出条件: 0-300分: B液0-100%の直線グラジエント溶出

300-420分: B液100%のイソクラティック溶出

流速: 1mL/分

カラム温度: 室温

実施例 7

[0075] 本実施例では、MbFKBP19.0を製造・精製した。

[0076] 1. MbFKBP19.0の製造

実施例2で調製した発現ベクターpMb19F2を大腸菌BL21(DE3)株に導入し、形質転換体を得た。次に、実施例5と同様にして、形質転換体を培養し、菌体回収後、菌体懸濁液を-20℃で凍結保存した。さらに、実施例5と同様にして菌体懸濁液を超音波処理し、その上清画分(可溶性画分)を得た。上清画分10 μ gをSDS-PAGEに供したところ、MbFKBP19.0に相当する濃いバンドが検出され、MbFKBP19.0が大量に可溶性画分に発現していることが確認された。

[0077] 2. MbFKBP19.0の精製

得られた上清画分を実施例6と同様にして疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過法、及び、陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、カラム精製を繰り返すことにより、MbFKBP19.0をほぼ単一にまで精製した。

実施例 8

[0078] 本実施例では、MaFKBP28.0を製造した。

[0079] 実施例5と同様にして、発現ベクターpMa28F2を含有する形質転換体の作製、培養、菌体破碎、可溶性画分と沈殿画分の調製、及びSDS-PAGEを行った。図4にゲルの写真を示す。図4において、左側のレーンが可溶性画分であり、右側のレーン

が沈殿画分である。すなわち、MaFKBP28. 0に相当するバンド(矢印)は、可溶性画分のみに検出された。以上より、MaFKBP28. 0は封入体になることなく、可溶状態で回収された。

実施例 9

[0080] 本実施例では、MaFKBP17. 8が分子シャペロン活性を有することを確認した。

[0081] 6M 塩酸グアニジン及び5mM DTTを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7. 8)にロダネーゼを最終濃度63 μ Mになるよう溶解し、25℃で60分処理し、ロダネーゼを変性させた。得られた変性ロダネーゼ溶液を10 μ M MaFKBP17. 8及び10mM DTTを含む50mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7. 8)で60倍に希釈し、そのまま45分間処理した。処理後、再生したロダネーゼの活性をホロビッチ (Methods in Molecular Biology 40, 361–368(1995))の方法に従って評価した。再生したロダネーゼ活性の値を、ネイティブ型ロダネーゼの活性を100%とした相対値で表し、分子シャペロン活性とした。対照として、MaFKBP17. 8を添加しなかった溶液におけるロダネーゼの活性を測定した。結果を図5に示す。すなわち、MaFKBP17. 8非存在下では、ロダネーゼは5%程度しか再生しなかったのに対し、MaFKBP17. 8存在下では約76%のロダネーゼが再生した。以上より、MaFKBP17. 8の作用によって変性ロダネーゼが正しく折り畳まれて正常型のロダネーゼに再生されることが示された。

実施例 10

[0082] 本実施例では、MaFKBP17. 8と超好熱菌 (*Aeropyrum pernix*) 由来ロダネーゼからなる融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。さらに、該発現ベクターを含有する形質転換体を作製した。さらに、該形質転換体を培養することにより、該融合タンパク質を製造した。さらに、疎水性相互作用クロマトグラフィーを用い、該培養物より該融合タンパク質を精製した。さらに、精製された該融合タンパク質からロダネーゼを切り出し、ロダネーゼを正常型タンパク質として取得した。

[0083] 1. 発現ベクターの構築と形質転換体の作製

理化学研究所より入手した *Aeropyrum pernix* (JCM9820. DSM11879と同じ。)の菌ペレットを用いて実施例1と同様の方法によりゲノムDNAを調製した。一方、

配列番号40に示される公知のA. *pernix*由来ロダネーゼ遺伝子の塩基配列を参考にして、PCR用のプライマーとして配列番号25に示されるApTS-F1プライマー及び配列番号26に示されるApTS-R1プライマーを合成した。次に、得られたゲノムDNAを鋳型とし、ApTS-F1プライマー及びApTS-R1プライマーをプライマー対としてPCRを行い、A. *pernix*由来ロダネーゼ遺伝子を増幅した。増幅されたDNA断片の塩基配列を確認したところ、公知のA. *pernix*由来ロダネーゼ遺伝子の塩基配列と一致した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、ApTS-F1の5'末端に由来するNdeIサイト及びApTS-R1の3'末端に由来するHindIIIサイトが導入された。次に、A. *pernix*由来ロダネーゼ遺伝子を含む増幅DNA断片をNdeI/HindIIIにて処理し、実施例3で構築した発現ベクターpMa17F2のNdeI/HindIIIサイトに挿入し、MaFKBP17.8とA. *pernix*由来ロダネーゼとの融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。すなわち、該発現ベクターは、T7プロモーターの下流に、順に、第1コード領域となるMaFKBP17.8遺伝子、トロンピン認識アミノ酸配列をコードするアミノ酸配列、及び第2コード領域となるA. *pernix*由来ロダネーゼをコードする遺伝子を有する。よって、該発現ベクターによれば、MaFKBP17.8とA. *pernix*由来ロダネーゼとの融合タンパク質を発現することができる。また、発現される該融合タンパク質は、MmFKBP17.8とA. *pernix*由来ロダネーゼの間にトロンピン消化アミノ酸配列を有する。次に、構築した発現ベクターを大腸菌BL21 (DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。

[0084] 2. 融合タンパク質の製造

作製した形質転換体を、実施例5と同様の方法により培養、回収した後、菌体破砕液の可溶性画分及び封入体画分を得た。実施例5と同様にして可溶性画分と封入体画分をSDS-PAGEに供し、CBBにてゲルを染色した。ゲルの写真を図6(a)に示す。すなわち、MaFKBP17.8とA. *pernix*由来ロダネーゼとの融合タンパク質(図中では「MaFKBP17.8-rho融合タンパク質」と表示))に相当するバンド(矢印)が、可溶性画分に認められた。以上より、A. *pernix*由来ロダネーゼはMaFKBP17.8との融合タンパク質とすることにより、封入体とはならず、可溶状態で合成された。

[0085] 3. 融合タンパク質の精製

得られた可溶性画分を実施例5と同様の条件で疎水性相互作用クロマトグラフィー及びゲル濾過の順でカラム精製を繰り返すことにより、MaFKBP17. 8とA. pernix由来ロダネーゼの融合タンパク質を精製した。

[0086] 4. ロダネーゼの製造

精製した融合タンパク質1mgあたりに1Uのトロンبینを加え、22℃にて16時間処理した。反応液をSDS-PAGEに供し、CBBにてゲルを染色した。ゲルの写真を図6(b)に示す。左側のレーンはトロンبین添加前、右側のレーンはトロンبین添加・処理後の試料である。すなわち、トロンبین添加前の試料ではMaFKBP17. 8とA. pernix由来ロダネーゼとの融合タンパク質のみが検出されたが、トロンبین添加・処理後の試料では当該融合タンパク質は検出されず、ロダネーゼに相当するバンドとMaFKBP17. 8に相当するバンドが検出された。以上より、MaFKBP17. 8とA. pernix由来ロダネーゼとの融合タンパク質のトロンبین認識サイトが切断され、ロダネーゼが切り出されていることが確認された。

[0087] 比較例として、以下の手順でA. pernix由来ロダネーゼ遺伝子を単独で発現させた。実施例10で調製したA. pernix由来ロダネーゼ遺伝子のNdeI/HindIII消化産物を、あらかじめNdeI/HindIIIにより処理しておいたpET21aプラスミドDNAに挿入し、A. pernix由来ロダネーゼを単独で発現する発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを大腸菌E. coli BL21 (DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。作製した形質転換体を実施例4と同様の方法で培養・回収し、得られた菌体破碎液の可溶性画分及び封入体画分をSDS-PAGEに供し、CBBにてゲルを染色した。ゲルの写真を図6(c)に示す。左側のレーンは可溶性画分、右側のレーンは沈殿画分である。すなわち、A. pernix由来ロダネーゼ(矢印)は封入体画分にのみ検出され、可溶性画分にはほとんど検出されなかった。

以上より、A. pernix由来ロダネーゼは、大腸菌内で単独で発現させると封入体となるが、MaFKBP17. 8との融合タンパク質にすると、封入体とならず、可溶性画分に合成されることが分かった。

実施例 11

[0088] 本実施例では、MaFKBP17. 8とFab抗体断片からなる融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。さらに、該発現ベクターを含有する形質転換体を作製した。さらに、該形質転換体を培養することにより、該融合タンパク質を製造した。

[0089] 1. 発現ベクターの構築と形質転換体の作製

マウス由来anti-HEL Fab抗体断片の発現ベクターpEHEL Fab-1 (Ideno, Appl. Env. Microbiol. 68, 464-471, 2002)をNdeI/Bpu1102Iにより処理し、アガロースゲル電気泳動により、anti-HEL Fab抗体断片の遺伝子断片を精製した。なお、この遺伝子断片は、Fab抗体断片の重鎖をコードする遺伝子とFab抗体断片の軽鎖をコードする遺伝子とが並んで配置され、転写によってポリシストロニックなmRNAが合成されるが、翻訳は別々に行われ、Fab抗体断片の重鎖と軽鎖とが融合タンパク質としてではなくそれぞれが単独で合成される。次に、実施例3で構築した発現ベクターpMa17F2のNdeI/Bpu1102Iサイトに、得られたanti-HEL Fab抗体断片の遺伝子断片を挿入することにより、MaFKBP17. 8とFab抗体断片の重鎖との融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。すなわち、該発現ベクターは、T7プロモーターの下流に、順に、第1コード領域となるMaFKBP17. 8遺伝子、トロンピン認識アミノ酸配列をコードするアミノ酸配列、及び第2コード領域となるFab抗体断片の重鎖をコードする遺伝子を有する。よって、該発現ベクターによれば、MaFKBP17. 8とFab抗体断片の重鎖との融合タンパク質を発現することができる。また、発現される該融合タンパク質は、MaFKBP17. 8とFab抗体断片の重鎖との間にトロンピン消化アミノ酸配列を有する。なお、Fab抗体断片の重鎖をコードする遺伝子の下流に位置しているFab抗体断片の軽鎖をコードする遺伝子により、Fab抗体断片の軽鎖は単独で合成される。次に、構築した発現ベクターを大腸菌BL21 (DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。

[0090] 2. 融合タンパク質の製造

作製した形質転換体を、実施例5と同様の方法により培養、回収した後、菌体破碎液の可溶性画分及び封入体画分を得た。実施例5と同様にして可溶性画分と封入体画分をSDS-PAGEに供し、CBBにてゲルを染色した。その結果、可溶性画分に

MaFKBP17. 8とFab重鎖の融合タンパク質のメジャーバンドが認められた。CBB染色した可溶性画分の電気泳動像から、該融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約19%が該融合タンパク質であり、該融合タンパクが大量に製造されていた。なお、Fabの軽鎖部分に相当するバンドは認められなかった。

- [0091] 比較例として、以下の手順でFab抗体断片遺伝子を単独で発現させた。実施例11で調製したFab抗体断片遺伝子のNdeI/Bpu1102I消化産物を、あらかじめNdeI/Bpu1102Iにより処理しておいたpET21aプラスミドDNAに挿入し、Fab抗体断片を単独で発現する発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを大腸菌BL21(DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。作製した形質転換体を実施例5と同様の方法で培養・回収し、得られた菌体破碎液の可溶性画分及び封入体画分をSDS-PAGEに供した。その結果、Fab抗体断片の重鎖は封入体画分にのみ検出された。以上より、Fab抗体断片の重鎖は、大腸菌内で単独で発現させると封入体となるが、MaFKBP17. 8との融合タンパク質にすると、封入体とならず、可溶性画分に合成されることが分かった。

実施例 12

- [0092] 本実施例では、MaFKBP17. 8とscFv抗体断片からなる融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。さらに、該発現ベクターを含有する形質転換体を作製した。さらに、該形質転換体を培養することにより、該融合タンパク質を製造した。

- [0093] 1. 発現ベクターの構築と形質転換体の作製

PCR用のプライマーとして配列番号27に示されるSCF-F3プライマー及び配列番号28に示されるSCF-R3プライマーを合成した。次に、プラスミドpAALSC(伊庭ら 1997、Gene 194、35-)を鋳型とし、SCF-F3プライマー及びSCF-R3プライマーをプライマー対としてPCRを行い、マウス由来anti-ニワトリリゾチーム(HEL) scFv抗体断片(D1. 3)遺伝子を増幅した。増幅された遺伝子をTAクローニングにより、pT7ブルーベクター(Novagen社)に挿入し、NdeI/NotI処理後、実施例3で構築したpMa17F2のNdeI/NotIサイトに挿入して、MaFKBP17. 8とscFv抗体

断片との融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。すなわち、該発現ベクターは、T7プロモーターの下流に、順に、第1コード領域となるMaFKBP17.8遺伝子、トロンビン認識アミノ酸配列をコードするアミノ酸配列、及び第2コード領域となるscFv抗体断片をコードする遺伝子を有する。よって、該発現ベクターによれば、MaFKBP17.8とscFv抗体断片との融合タンパク質を発現することができる。また、発現される該融合タンパク質は、MaFKBP17.8とscFv抗体断片の間にトロンビン消化アミノ酸配列を有する。次に、構築した発現ベクターを大腸菌BL21(DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。

[0094] 作製した形質転換体を、実施例5と同様の方法により培養、回収した後、菌体破砕液の可溶性画分及び封入体画分を得た。実施例5と同様にして可溶性画分と封入体画分をSDS-PAGEに供し、ゲルをCBBにて染色した。その結果、可溶性画分に、MaFKBP17.8とマウス由来anti-HEL scFv抗体断片の融合タンパク質のメジャーバンドが認められた。CBB染色した可溶性画分の電気泳動像から、該融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約18%が該融合タンパク質であり、該融合タンパクが大量に製造されていた。

[0095] 比較例として、以下の手順でマウス由来anti-HEL scFv抗体断片(D1.3)を単体で発現させた。実施例12で調製したマウス由来anti-ニワトリリゾチーム(HEL)scFv抗体フラグメント(D1.3)遺伝子断片を、あらかじめ制限酵素NdeI/Bpu1102I処理しておいたpET21aプラスミドDNAに挿入し、scFv抗体を単独で発現する発現ベクターを調製した。得られた発現ベクターを大腸菌BL21(DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。得られた形質転換体を実施例5と同様の方法で培養・回収し、得られた菌体破砕液の可溶性画分及び封入体画分をSDS-PAGEに供し、ゲルをCBBにて染色した。その結果、マウス由来anti-HEL scFv抗体は可溶画分にはほとんど発現せず、封入体画分に凝集体として発現することがわかった。以上より、マウス由来anti-HEL scFv抗体断片は、大腸菌内で単独で発現させると封入体となるが、MaFKBP17.8との融合タンパク質にすると、封入体とならず、可溶性画分に合成されることが分かった。

実施例 13

[0096] 本実施例では、MaFKBP17. 8とヒト由来セロトニン(HT1a)レセプターからなる融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。さらに、該発現ベクターを含有する形質転換体を作製した。さらに、該形質転換体を培養することにより、該融合タンパク質を製造した。

[0097] 1. 発現ベクターの構築と形質転換体の作製

公知のHT1aレセプター遺伝子の塩基配列情報(NCBIコード:HSSERR51)をもとに、PCR用のプライマーとして配列番号29に示されるHT1a-F1プライマー及び配列番号30に示されるHT1a-R1プライマーを合成した。次に、ヒト胎盤cDNAライブラリー(タカラバイオ社)を鋳型とし、HT1a-F1プライマー及びHT1a-R1プライマーをプライマー対としてPCRを行い、HT1aレセプター遺伝子を増幅した。増幅されたDNA断片をpT7ブルーTベクターに挿入後、その塩基配列を確認したところ、データベースの登録情報と一致した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、HT1a-F1の5'末端に由来するNdeIサイト及びHT1a-R1の3'末端に由来するNotIサイトが導入された。次に、HT1aレセプター遺伝子を含む増幅DNA断片をNdeI/NotIにて処理し、実施例3で構築した発現ベクターpMa17F2のNdeI/NotIサイトに挿入し、MaFKBP17. 8とHT1aレセプターとの融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。すなわち、該発現ベクターは、T7プロモーターの下流に、順に、第1コード領域となるMaFKBP17. 8遺伝子、トロンピン認識アミノ酸配列をコードするアミノ酸配列、及び第2コード領域となるHT1aレセプターをコードする遺伝子を有する。よって、該発現ベクターによれば、MaFKBP17. 8とHT1aレセプターとの融合タンパク質を発現することができる。また、発現される該融合タンパク質は、MaFKBP17. 8とHT1aレセプターの間にトロンピン消化アミノ酸配列を有する。次に、構築した発現ベクターを大腸菌BL21(DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。

[0098] 2. 融合タンパク質の製造

作製した形質転換体を、実施例5と同様の方法により培養、回収した後、菌体破砕液の可溶性画分及び封入体画分を得た。実施例5と同様にして可溶性画分と封入体画分をSDS-PAGEに供した。融合タンパク質の検出は、CBBによるゲル染色と、

抗セロトニンレセプター抗体を用いたウェスタンブロッティング法の両方を行った。その結果、可溶性画分にのみMaFKBP17. 8とHT1aレセプターの融合タンパク質が検出された。CBB染色した可溶性画分の電気泳動像から、該融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約2%が該融合タンパク質であった。

実施例 14

- [0099] 本実施例では、MaFKBP17. 8とscFv抗体断片を宿主細胞内で共発現させて、scFv抗体断片を製造した。
- [0100] 実施例12と同様にして、マウス由来anti-HEL scFv抗体断片の遺伝子を増幅した。この増幅DNA断片をpT7ブルーTベクターに挿入し、NdeI/NotI処理後、あらかじめNdeI/NotIにより処理しておいたpET21aプラスミドDNAに挿入し、上記scFvの発現ベクターpETscFvを構築した。次に、pETscFvを鋳型とし、配列番号35に示されるT7-F1プライマーと配列番号36に示されるT7-R1プライマーをプライマー対としてPCRを行い、上記scFv遺伝子及びT7プロモーター部を含むscFvの発現ユニットDNA断片を増幅した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、T7-F1プライマーの5'末端に由来するSph Iサイト及びT7-R1プライマーの3'末端に由来するBamHIサイトが導入された。この増幅DNA断片をTAクローニングによりpT7ブルーTベクターに挿入した後、制限酵素SphI/BamHIで処理後、pACYC184プラスミド(和光純薬社)のSphI/BamHIサイトに挿入し、共発現用ベクターpACscFvを構築した。
- [0101] 2種類のベクター、すなわち、共発現用ベクターpACscFvと実施例3で調製した発現ベクターpMa17F2を、コンピテントセル大腸菌JM109(DE3)株に導入し、100 μ g/mLアンピシリン及び100 μ g/mLクロラムフェニコールを含むLB寒天培地にて培養した。得られたコロニーを、100 μ g/mLアンピシリン及び100 μ g/mLクロラムフェニコールを含む2×YT培地700 mLに接種した。35℃で回転培養(110 rpm)した後、OD600が0. 6となった時点で100mM IPTGを7mL添加し、培養温度を20℃に下げてさらに約18時間培養し、MaFKBP17. 8及びマウス由来anti-HEL scFv抗体断片の発現を誘導した。培養終了後、遠心分離(10000 rpm×10分

)にて菌体を回収した。回収した菌体を1 mM EDTAを含む25 mM HEPES緩衝液(pH6.8) 20 mLに懸濁し、-20℃にて一晚凍結保存した。菌体を融解し、超音波破碎を行って上清(可溶画分)及び沈殿画分に分離し、それぞれをSDS-PAGEに供し、CBBにて染色した。一方、比較例として、pACscFvのみを導入した組換え大腸菌についても同様の操作を行った。その結果、pACscFvのみを導入した組換え大腸菌ではscFv抗体断片は全て沈殿画分に検出されたが、pACscFvとpMa17F2の両方を導入した組換え大腸菌では、scFv抗体断片は上清画分に検出された。以上より、MaFKBP17.8と共発現させることにより、scFvは可溶性画分に発現させることが可能となった。

実施例 15

[0102] 本実施例では、MaFKBP28.0とscFv抗体断片からなる融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。さらに、該発現ベクター含有する形質転換体を作製した。さらに、該形質転換体を培養することにより、該融合タンパク質を製造した。

[0103] 1. 発現ベクターの構築

実施例12で調製したscFv抗体断片遺伝子を含む増幅DNA断片をNdeI/NotIにて処理し、実施例4で構築した発現ベクターpMa28F2のNdeI/NotIサイトに挿入し、MaFKBP28.0とscFv抗体断片との融合タンパク質を発現することができる発現ベクターMa28F2-scFvを構築した。すなわち、発現ベクターMa28F2-scFvは、T7プロモーターの下流に、順に、第1コード領域となるMaFKBP28.0遺伝子、トロニン認識アミノ酸配列をコードするアミノ酸配列、及び第2コード領域となるscFv抗体断片をコードする遺伝子を有する。よって、該発現ベクターによれば、MaFKBP28.0とscFv抗体断片との融合タンパク質を発現することができる。また、発現される該融合タンパク質は、MaFKBP28.0とscFv抗体断片の間にトロニン消化アミノ酸配列を有する。次に、構築した発現ベクターMa28F2-scFvを大腸菌BL21(DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。

[0104] 2. 融合タンパク質の製造

作製した形質転換体を、実施例5と同様の方法により培養、回収した後、菌体破碎

液の可溶性画分及び封入体画分を得た。実施例5と同様にして可溶性画分と封入体画分をSDS-PAGEに供し、CBBにてゲルを染色した。ゲルの写真を図7(a)に示す。すなわち、MaFKBP28. 0とscFv抗体断片との融合タンパク質(図中では「MaFKBP28. 0-scFv融合タンパク質」と表示)に相当するバンド(矢印)が、可溶性画分に認められた。以上より、scFv抗体断片はMaFKBP28. 0との融合タンパク質とすることにより、封入体とはならず、可溶状態で合成された。

実施例 16

[0105] 本実施例では、MaFKBP28. 0とA. pernix由来ロダネーゼからなる融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。さらに、該発現ベクター含有する形質転換体を作製した。さらに、該形質転換体を培養することにより、該融合タンパク質を製造した。

[0106] 1. 発現ベクターの構築と形質転換体の作製

実施例10で調製したA. pernix由来ロダネーゼ遺伝子を含む増幅DNA断片をNdeI/HindIIIにて処理し、実施例4で構築した発現ベクターpMa28F2のNdeI/HindIIIサイトに挿入し、MaFKBP28. 0とA. pernix由来ロダネーゼとの融合タンパク質を発現することができる発現ベクターpMa28F2-rhoを構築した。すなわち、発現ベクターpMa28F2-rhoは、T7プロモーターの下流に、順に、第1コード領域となるMaFKBP28. 0遺伝子、トロンビン認識アミノ酸配列をコードするアミノ酸配列、及び第2コード領域となるA. pernix由来ロダネーゼをコードする遺伝子を有する。よって、該発現ベクターによれば、MaFKBP28. 0とA. pernix由来ロダネーゼとの融合タンパク質を発現することができる。また、発現される該融合タンパク質は、MaFKBP28. 0とA. pernix由来ロダネーゼの間にトロンビン消化アミノ酸配列を有する。次に、構築した発現ベクターpMa28F2-rhoを大腸菌BL21 (DE3) 株に導入し、形質転換体を作製した。

[0107] 2. 融合タンパク質の製造

作製した形質転換体を、実施例5と同様の方法により培養、回収した後、菌体破砕液の可溶性画分及び封入体画分を得た。実施例5と同様にして可溶性画分と封入体画分をSDS-PAGEに供し、CBBにてゲルを染色した。ゲルの写真を図7(b)に

示す。すなわち、MaFKBP28. 0とA. *pernix*由来ロダネーゼとの融合タンパク質(図中では「MaFKBP28. 0-rho融合タンパク質」と表示)に相当するバンド(矢印)が、可溶性画分に認められた。以上より、A. *pernix*由来ロダネーゼはMaFKBP28. 0との融合タンパク質とすることにより、封入体とはならず、可溶状態で合成された。

実施例 17

[0108] 本実施例では、MaFKBP28. 0とオワンクラゲ由来天然型GFP (Green fluorescent protein) からなる融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。さらに、該発現ベクターを含有する形質転換体を作製した。さらに、該形質転換体を培養することにより、該融合タンパク質を製造した。

[0109] 1. 発現ベクターの構築と形質転換体の作製

PCR用のプライマーとして配列番号31に示されるGFP-F1プライマー及び配列番号32に示されるGFP-R1プライマーを合成した。次に、オワンクラゲ由来天然型GFP遺伝子を含む発現ベクターであるコントロールベクターGFP(ロシュダイアグノスティックス社製Cell-free protein translation systemキットに含まれているもの)を鋳型とし、GFP-F1プライマー及びGFP-R1プライマーをプライマー対としてPCRを行い、オワンクラゲ由来天然型GFP遺伝子を増幅した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、GFP-F1の5'末端に由来するBamHIサイト及びGFP-R1の3'末端に由来するEcoRIサイトが導入された。増幅されたDNA断片をTAクローニングによりpT7ブルーベクターに挿入し、塩基配列を確認したところ、データベースに登録されているオワンクラゲ由来天然型GFP遺伝子の塩基配列と一致した。増幅されたDNA断片をBamHI/EcoRIで処理後、実施例4で構築したpMa28F2のBamHI/EcoRIでサイトに挿入して、MaFKBP28. 0とオワンクラゲ由来天然型GFPとの融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。すなわち、該発現ベクターは、T7プロモーターの下流に、順に、第1コード領域となるMaFKBP28. 0遺伝子、トロンビン認識アミノ酸配列をコードするアミノ酸配列、及び第2コード領域となるオワンクラゲ由来天然型GFPをコードする遺伝子を有する。よって、該発現ベクターによれば、MaFKBP28. 0とオワンクラゲ由来天然型GFPとの融合タンパク質を発現することができる。また、発現される該融合タンパク質は、MaFKBP28. 0とオワ

ンクラゲ由来天然型GFPの間にトロンピン消化アミノ酸配列を有する。次に、構築した発現ベクターを大腸菌BL21 (DE3)株に導入し、形質転換体を作製した。

[0110] 2. 融合タンパク質の製造

作製した形質転換体を、実施例5と同様の方法(ただし、培養温度は15℃)により培養、回収した後、菌体破碎液の可溶性画分及び封入体画分を得た。実施例5と同様にして可溶性画分と封入体画分をSDS-PAGEに供し、CBBによりゲルを染色した。ゲルの写真を図7(c)に示す。すなわち、MaFKBP28. 0とオワンクラゲ由来天然型GFPとの融合タンパク質(図中では「MaFKBP28. 0-GFP融合タンパク質」と表示)に相当するバンド(矢印)が、可溶性画分に認められた。以上より、オワンクラゲ由来天然型GFPはMaFKBP28. 0との融合タンパク質とすることにより、封入体とはならず、可溶状態で合成された。CBB染色した可溶性画分の電気泳動像から、該融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約28%が該融合タンパク質であり、大量に発現していた。

[0111] 比較例として、超好熱古細菌由来FKBP型PPIaseで同様の操作を行った。すなわち、超好熱性古細菌*Thermococcus* sp. KS-1由来ショートタイプFKBP型PPIase (TcFKBP18)の発現プラスミドpEFE1-3 (Iida, Gene 222, 249-1, 1998)を鋳型とし、配列番号33に示されるTcFu-F1プライマー及び配列番号34に示されるTcFu-R2プライマーをプライマー対としてPCRを行い、TcFKBP18遺伝子を含むDNA断片を増幅した。なお、増幅されたDNA断片の両端には、TcFu-F1の5'末端に由来するNcoIサイト及びTcFu-R2の3'末端に由来するSpeIサイトが導入された。増幅されたDNA断片をpT7ブルーTベクターに挿入して塩基配列を確認したところ、データベースに登録されている塩基配列と一致した。増幅されたDNA断片を制限酵素NcoI/SpeIで処理後、実施例3で構築したpMa17F2のNcoI/SpeIにサイトを挿入して、TcFKBP18とオワンクラゲ由来天然型GFPとの融合タンパク質を発現することができる発現ベクターを構築した。すなわち、この発現ベクターは実施例17で構築した発現ベクターのMaFKBP28. 0遺伝子がTcFKBP18遺伝子に置き換わったものである。この発現ベクターを用いて実施例17と同様にして、形質転換体の作製、培養、及び菌体破碎物のSDS-PAGEを行った。その結果、実施例17と同様

に、可溶性画分にTcFKBP18とオワンクラゲ由来天然型GFPの融合タンパク質が検出された。CBB染色した可溶性画分の電気泳動像から、該融合タンパク質のバンド密度をデンストメータで測定した結果、大腸菌由来全可溶性タンパク質の約19%が該融合タンパク質であり、大量に発現していた。

[0112] 実施例17と上記比較例の各融合タンパク質の濃度を同一とした溶液試料を調製し、UVBを照射した。その結果、いずれの試料も蛍光を発したが、MaFKBP28.0との融合タンパク質を含む試料の蛍光強度は、TcFKBP18との融合タンパク質を含む試料の蛍光強度の約2倍であった。以上より、可溶性画分から得られたFKBP型PPlaseとオワンクラゲ由来天然型GFPとの融合タンパク質において、MaFKBP28.0との融合タンパク質の方がTcFKBP18との融合タンパク質に比べて、より多くのオワンクラゲ由来天然型GFPが正しく折り畳まれた。

[0113] 以下の表に、上記した実施例で用いたPCR用のプライマーの塩基配列、制限酵素サイト、及び配列番号をまとめて記載した。

[表1]

プライマー	塩基配列	制限酵素 サイト	配列番号
Mm18-F1	5' - <u>GGCCATGGG</u> ATTGATTGTTATGACTGAG-3'	<i>Nco</i> I	19
Mm18-R1	5' -CCACTAGTTCATTCTCCTCCACTG-3'	<i>Spe</i> I	20
Mb19-F1	5' - <u>GGGCATGCG</u> ATTCTCGTTTGTTTTATTGATTTTTATG-3'	<i>Sph</i> I	21
Mb19-R1	5' -CCACTAGTTCACTCCTCCAC-3'	<i>Spe</i> I	22
Ma17.8-F1	5' - <u>GGCCATGGG</u> AACTGAAGAGACAATTA AAAAC-3'	<i>Nco</i> I	23
Ma17.8-R1	5' -CCACTAGTTTATGCCTCCAATG-3'	<i>Spe</i> I	24
ApTS-F1	5' - <u>GGCATATGT</u> CGAGGCTTGGCGTAGA-3'	<i>Nde</i> I	25
ApTS-R1	5' -CTGAA <u>TTCT</u> CAGGGTTCGTCCCGCTTCT-3'	<i>Hind</i> III	26
SCF-F3	5' -ATCATATGAAATACCTATTGCCTACG-3'	<i>Nde</i> I	27
SCF-R3	5' -ATGCGGCGCGCTATTACTCCAGCTTGGTCCCTC-3'	<i>Not</i> I	28
HT1a-F1	5' -ATCATATGGATGTGCTCAGCC-3'	<i>Nde</i> I	29
HT1a-R1	5' -ATGCGGCGCGCTAGCGCCAG-3'	<i>Not</i> I	30
GFP-F1	5' -GGGGATCCAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACT-3'	<i>Bam</i> HI	31
GFP-R1	5' -CCGAA <u>TTCT</u> TATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG-3'	<i>Eco</i> RI	32
Tcfu-F1	5' -GGCCATGGGAAAAGTTGAAGCTGGTGAT-3'	<i>Nco</i> I	33
Tcfu-R2	5' -CCACTAGTAGCTTCTGAGTCCTCTTC-3'	<i>Spe</i> I	34
T7-F1	5' -GCATGCTAATACGACTCACTATA-3'	<i>Sph</i> I	35
T7-R1	5' -GGATCCCAAAAAACCCCTC-3'	<i>Bam</i> HI	36
Ma28-F1	5' -ACCCATGGGTGCAATTCAGAAAGGCGATTT-3'	<i>Nco</i> I	37
Ma28-R1	5' -GGACTAGTTTCATGGGATTCTGAAGTCTCTTC-3'	<i>Spe</i> I	38

※アンダーラインは制限酵素サイトを示す。

請求の範囲

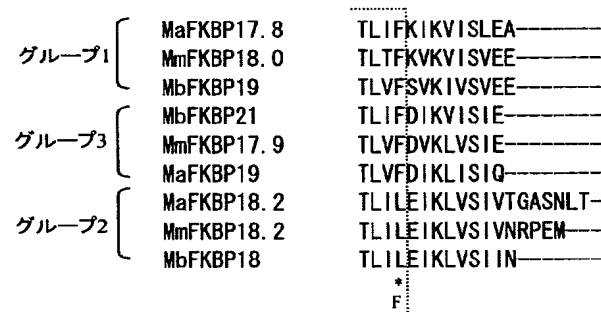
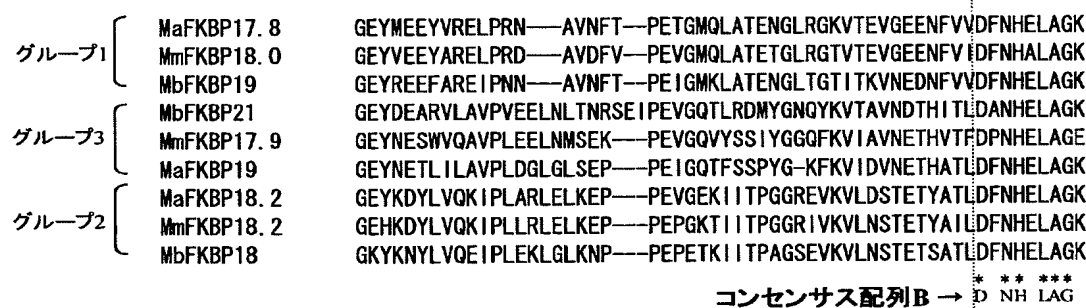
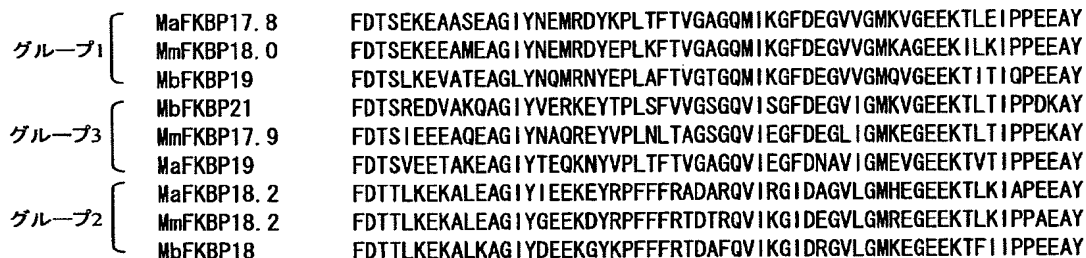
- [1] メタン生成菌に属する常温性古細菌に由来することを特徴とするFKBP型PPIase。
- [2] 前記常温性古細菌は、Methanosarcina属古細菌であることを特徴とする請求項1記載のFKBP型PPIase。
- [3] ショートタイプFKBP型PPIaseであることを特徴とする請求項1又は2記載のFKBP型PPIase。
- [4] 配列番号1、2又は3で表されるアミノ酸配列からなるモチーフを、その一部に含むアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1、2又は3記載のFKBP型PPIase。
- [5] 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるモチーフを、そのN末端領域に含まないアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1、2、3又は4記載のFKBP型PPIase。
- [6] 配列番号6に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするFKBP型PPIase。
- [7] 配列番号8に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするFKBP型PPIase。
- [8] 配列番号10に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするFKBP型PPIase。
- [9] ロングタイプFKBP型PPIaseであることを特徴とする請求項1又は2記載のFKBP型PPIase。
- [10] 配列番号18に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするFKBP型PPIase。
- [11] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10記載のFKBP型PPIaseと実質的に同一のアミノ酸配列を有し、かつ、実質的に同一の活性を有することを特徴とするFKBP型PPIase。
- [12] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11記載のFKBP型PPIaseをコードする第1コード領域と、少なくとも1つの制限酵素サイトを有し、前記制限酵素サイトに目的タンパク質をコードする第2コード領域を挿入することによりFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を発現することができることを特徴とする発現ベクター。
- [13] 前記制限酵素サイトは、前記第1コード領域の下流に位置することを特徴とする請求項12記載の発現ベクター。
- [14] 前記第1コード領域と前記制限酵素サイトの間に、ペプチドリンカーをコードする塩

- 基配列を有することを特徴とする請求項12又は13記載の発現ベクター。
- [15] 前記ペプチドリンカーは、プロテアーゼ消化アミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項14記載の発現ベクター。
- [16] 請求項12、13、14又は15記載の発現ベクターの制限酵素サイトに、目的タンパク質をコードする第2コード領域が組み込まれていることを特徴とする発現ベクター。
- [17] 前記第2コード領域は、抗体又は抗体の部分断片をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項16記載の発現ベクター。
- [18] 前記第2コード領域は、細胞内受容体タンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項16記載の発現ベクター。
- [19] 請求項16、17又は18記載の発現ベクターを含有することを特徴とする形質転換体。
- [20] 宿主が大腸菌であることを特徴とする請求項19記載の形質転換体。
- [21] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11記載のFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質。
- [22] 前記FKBP型PPIaseと前記目的タンパク質との間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列を有することを特徴とする請求項21記載の融合タンパク質。
- [23] 請求項16記載の発現ベクターに組み込まれた第1コード領域及び第2コード領域を転写及び翻訳させ、FKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を合成することを特徴とする融合タンパク質の製造方法。
- [24] 請求項16記載の発現ベクターに組み込まれた第1コード領域及び第2コード領域を転写及び翻訳させ、FKBP型PPIaseと目的タンパク質の融合タンパク質を合成し、次いで、該融合タンパク質から目的タンパク質を切り出すことを特徴とする目的タンパク質の製造方法。
- [25] 前記発現ベクターは第1コード領域と第2コード領域の間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、第1コード領域と、プロテアーゼ消化アミノ酸配列をコードする塩基配列と、第2コード領域とを転写及び翻訳させ、FKBP型PPIaseと目的タンパク質との間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列を有する融合タンパク質を合成し、該融合タンパク質に該プロテアーゼを作用させることにより目的タンパク質を

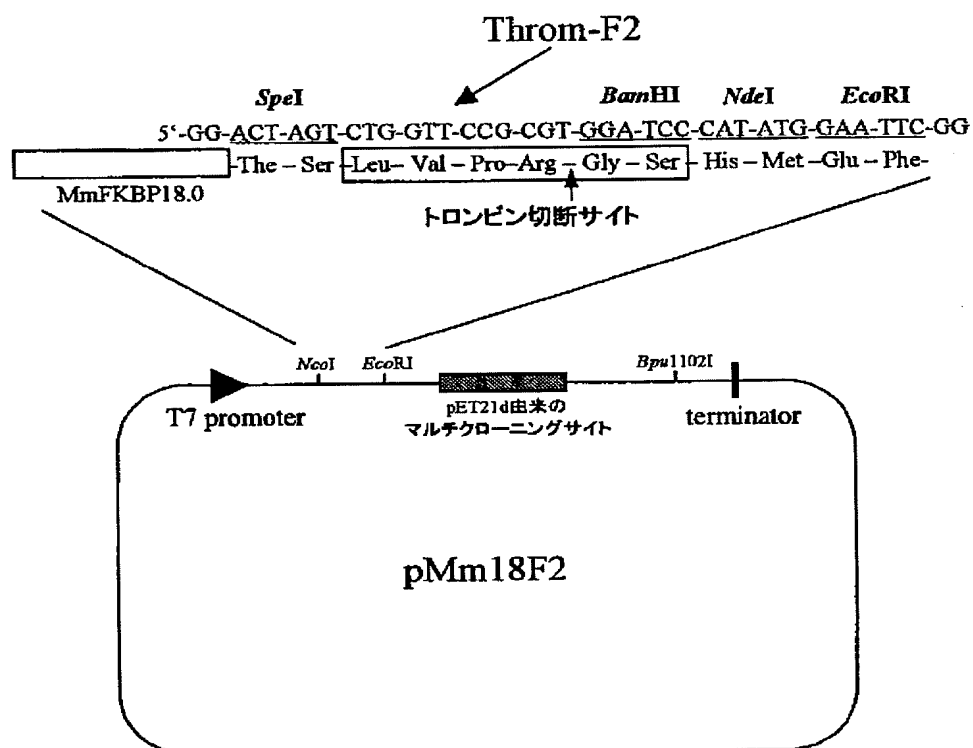
切り出すことを特徴とする請求項24に記載の目的タンパク質の製造方法。

- [26] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11記載のFKBP型PPIaseをコードする遺伝子と目的タンパク質をコードする遺伝子を同一宿主内で共発現させることにより、宿主内で目的タンパク質にFKBP型PPIaseを作用させ、目的タンパク質を可溶化し、宿主の可溶画分から目的タンパク質を採取することを特徴とする目的タンパク質の製造方法。
- [27] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11記載のFKBP型PPIaseを含む試料を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供することにより、該FKBP型PPIase以外の成分を除去することを特徴とするFKBP型PPIaseの精製方法。
- [28] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11記載のFKBP型PPIaseと目的タンパク質との融合タンパク質を含む試料を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供することにより、該融合タンパク質以外の成分を除去することを特徴とする融合タンパク質の精製方法。

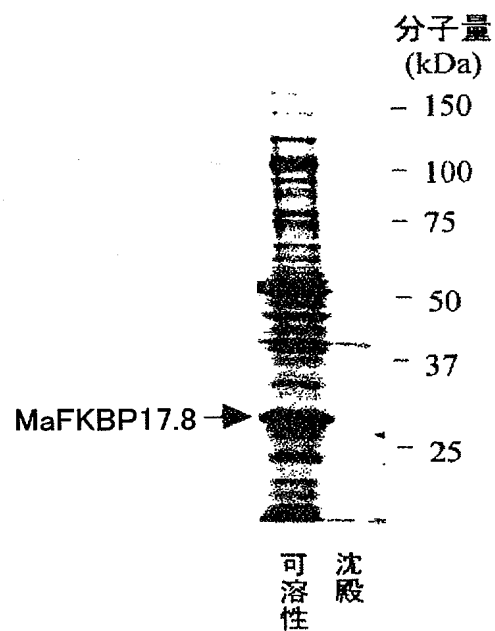
[図1]



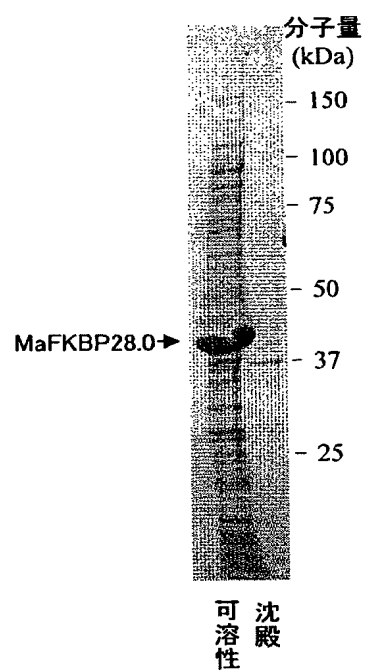
[図2]



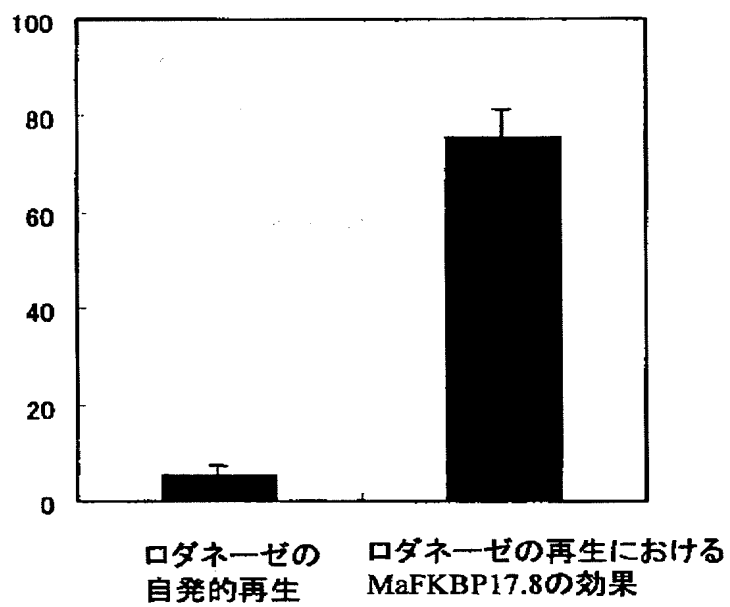
[図3]



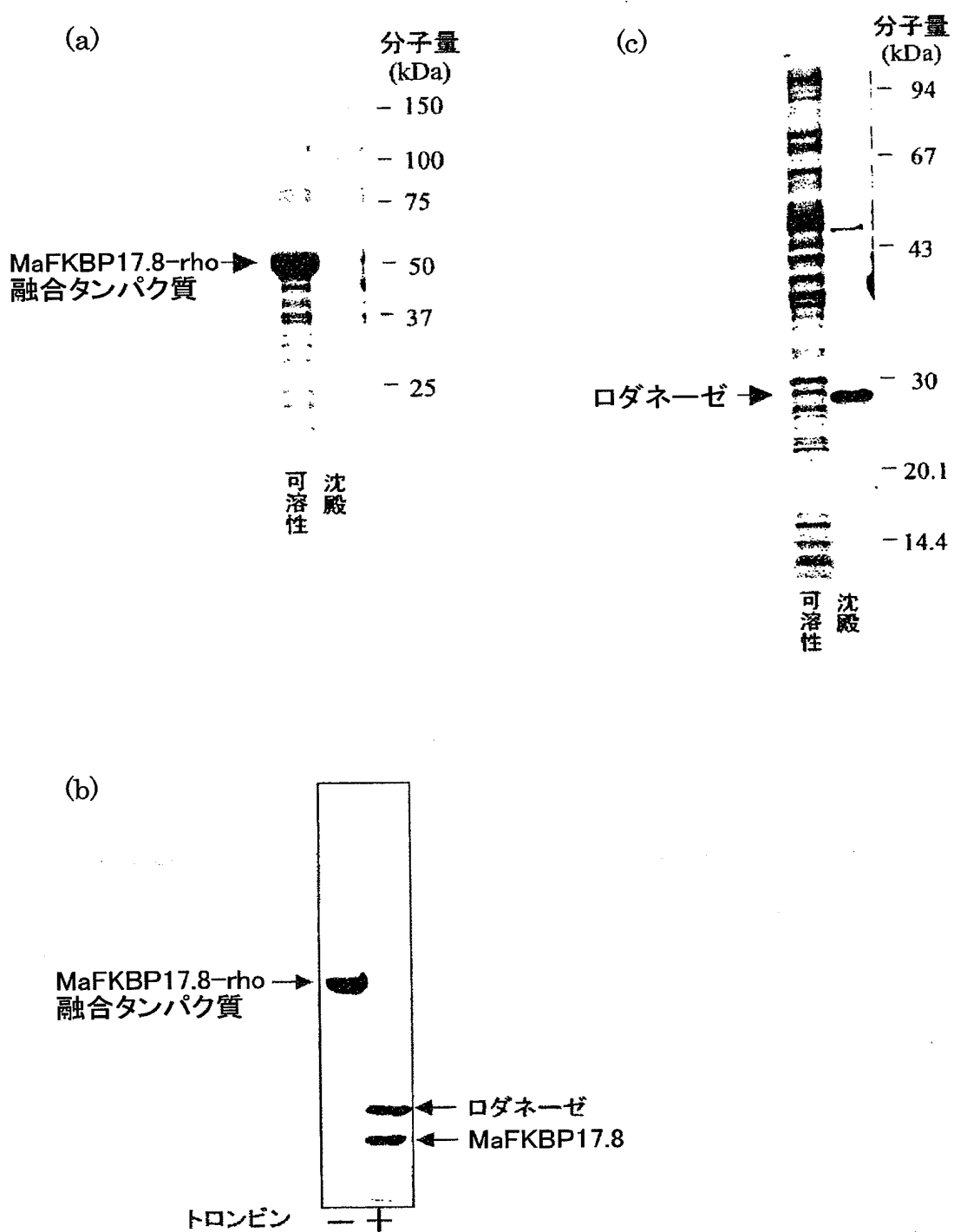
[図4]



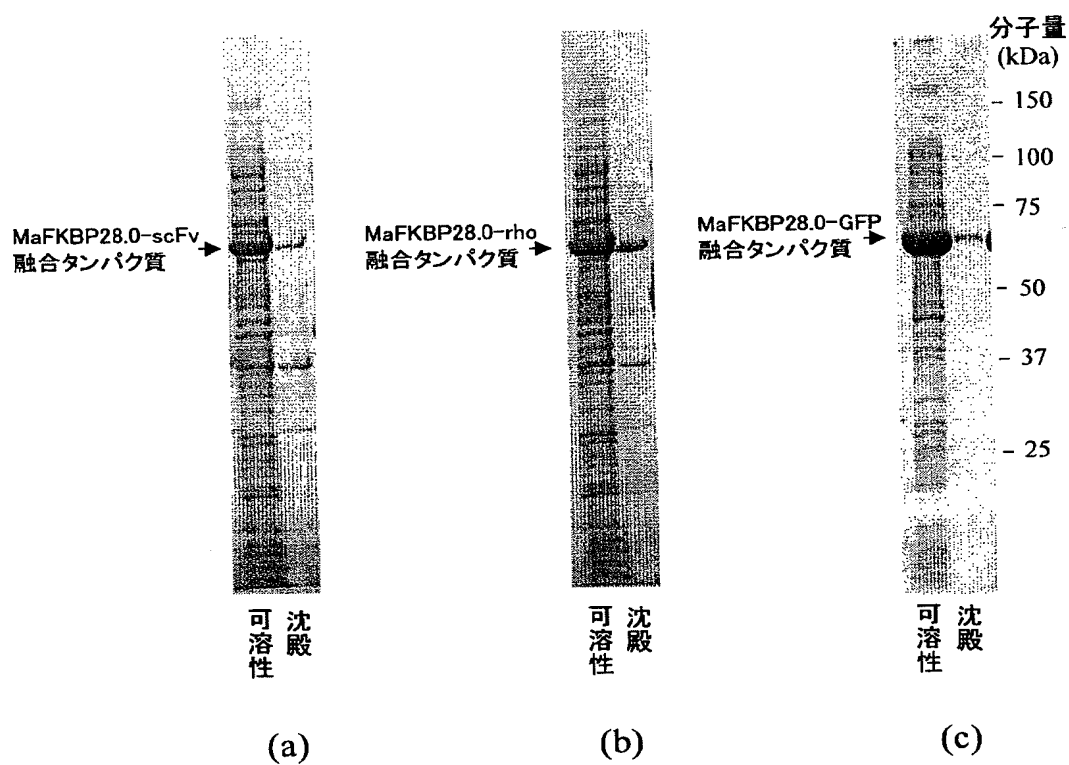
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/21, 9/90, 15/61, C07K16/40, 19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/21, 9/90, 15/61, C07K16/40, 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2001-66309 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 16 March, 2001 (16.03.01), (Family: none)	<u>1-8, 11-25, 27</u> <u>9, 10, 26</u>
<u>X</u> <u>A</u>	Deppenmeier U. et al., Methanosarcina mazei strain Goel, section 45 of 379 of the complete genome. GenBank, 07 February, 2003 (07.02.03), Accession No.AE013263	<u>1-8, 11</u> <u>9, 10, 12-28</u>
<u>X</u> <u>Y</u> <u>A</u>	Galagan JE. et al., Methanosarcina acetivorans str. C2A, section 326 of 534 of the complete genome. GenBank, 03 April, 2002 (03.04.02), Accession No.AE010981	<u>9-11</u> <u>12-28</u> <u>1-8</u>
<u>Y</u> <u>A</u>	JP 2002-262883 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 17 September, 2002 (17.09.02), (Family: none)	<u>26</u> <u>1-25, 27, 28</u>

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 March, 2005 (29.03.05)

Date of mailing of the international search report
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N1/21, 9/90, 15/61, C07K16/40, 19/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N1/21, 9/90, 15/61, C07K16/40, 19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X <u>Y</u>	J P 2001-66309 A (積水化学工業株式会社) 2001.03.16 (ファミリーなし)	1-8, 11-25, 27 9, 10, 26
<u>X</u> A	Deppenmeier U. et al., Methanosarcina mazei strain Goel, section 45 of 379 of the complete genome. GenBank, 2003.02.07 Accession No. AE013263	<u>1-8, 11</u> 9, 10, 12-28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.03.2005

国際調査報告の発送日

26.04.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4 N

3 2 2 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	Galagan JE. et al., Methanosarcina acetivorans str. C2A, section 326 of 534 of the complete genome. GenBank, 2002.04.03 Accession No. AE010981	<u>9-11</u> <u>12-28</u> 1-8
<u>Y</u> A	J P 2 0 0 2 - 2 6 2 8 8 3 A (積水化学工業株式会社) 2 0 0 2 . 0 9 . 1 7 (ファミリーなし)	<u>26</u> 1-25, 27, 28

[Example 1]

[0057]

In the present example, an expression vector that allows expression of a fusion protein of a target protein and a short type FKBP-type PPIase (MmFKBP18.0) derived from a methanogenic archaeobacterium *Methanosarcina mazei* was constructed. It is noted that MmFKBP18.0 is a group 1-type short type FKBP-type PPIase.

[0058]

10 A bacterial pellet was harvested from a bacterial suspension of *Methanosarcina mazei* Goel (DSM3647), and a genomic DNA was recovered by a phenol/chloroform treatment and ethanol precipitation. On the other hand, an Mm18-F1 primer shown in SEQ ID No: 19 and an Mm18-R1 primer shown
15 in SEQ ID No: 20 were synthesized as primers for PCR based on the known base sequence of the MmFKBP18.0 gene shown in SEQ ID No: 5. Next, PCR was carried out using the obtained genomic DNA as a template and the Mm18-F1 primer and the Mm18-R1 primer as a primer set to amplify the MmFKBP18.0
20 gene. The amplified DNA fragments were confirmed to have the same base sequence as the known base sequence of the MmFKBP18.0 gene. Here, either an NcoI site derived from the 5'-end of the Mm18-F1 primer or an SpeI site derived from 3'-end of the Mm18-R1 primer was introduced at each
25 end of the amplified DNA fragments.

[0059]

In addition, a linker Throm-F2 shown in SEQ ID No: 39 and a linker Throm-R2 (complementary strand of the linker Throm-F2) were synthesized. It is noted that the linker
30 Throm-F2 contains an SpeI site on the 5'-side, an EcoRI site on the 3'-side, and also contains a BamHI site and an NdeI site between both sites for introducing the gene of the target protein. The linker Throm-F2 further contains a base sequence that is translated into a thrombin
35 recognition amino acid sequence upstream of the BamHI site,

which in turn allows cleavage of the target protein from the fusion protein by thrombin (Fig. 2). Next, the linkers Throm-F2 and Throm-R2 were annealed to prepare a double-strand linker Throm.

5 [0060]

The amplified DNA fragment containing the MmFKBP18.0 gene and the double-strand linker Throm were treated with NcoI/SpeI and SpeI/EcoRI respectively, and ligated to a pET21d plasmid DNA (manufactured by Novagen) that had been
10 treated with NcoI/EcoRI in advance, in an order of MmFKBP18.0 gene-double-strand linker. Thus, an expression vector pMm18F2 was constructed. Fig. 2 shows the construction of the expression vector pMm18F2. The expression vector pMm18F2 contains the MaFKBP18.0 gene as a
15 first coding region, the base sequence encoding the thrombin recognition amino acid sequence, the BamHI site, and the NdeI site downstream of a T-7 promoter in this order. Insertion of a gene encoding the target protein to be a second coding region at the BamHI site or the NdeI
20 site allows expression of the fusion protein of MmFKBP18.0 and the target protein. The fusion protein to be expressed contains thrombin digestive amino acid sequence between MmFKBP18.0 and the target protein.

[Example 2]

25 omitted

[Example 3]

[0063]

In the present example, an expression vector that
30 allows expression of a fusion protein of the target protein and a short type FKBP-type PPIase (MaFKBP17.8) derived from a methanogenic archaeobacterium Methanosarcina acetivorans was constructed. It is noted that MaFKBP17.8 is a group 1-type short type FKBP-type PPIase.

35 [0064]

A bacterial pellet was harvested from a bacterial suspension of *Methanosarcina acetivorans* C2A (DSM2834), and a genomic DNA was recovered by following the same procedure as in Example 1. An Ma17.8-F1 primer shown in SEQ ID No: 23 and an Mm17.8-R1 primer shown in SEQ ID No: 24 were synthesized as primers for PCR based on the known base sequence of the MaFKBP17.8 gene shown in SEQ ID No: 7. Next, PCR was carried out using the obtained genomic DNA as a template and the Ma17.8-F1 primer and the Ma17.8-R1 primer as a primer set to amplify the MaFKBP17.8 gene. The amplified DNA fragments were confirmed to have the same base sequence as the known base sequence of the MaFKBP17.8 gene. Here, either an NcoI site derived from the 5'-end of the Ma17.8-F1 primer or an SpeI site derived from 3'-end of the Ma17.8-R1 primer was introduced at each end of the amplified DNA fragments. Next, the amplified DNA fragment containing the MaFKBP17.8 gene and the double-strand linker Throm were ligated to a pET21 plasmid DNA by following the same procedure as in Example 1. Thus, an expression vector pMa17F2 was constructed. The expression vector pMa17F2 contains the same construction as that of the expression vector pMm18F2 shown in Fig. 2, but contains the MaFKBP17.8 gene instead of the MmFKBP18.0 gene.

[Example 4]

25 [0065]

In the present example, an expression vector that allows expression of a fusion protein of the target protein and a long type FKBP-type PPIase (MaFKBP28.0) derived from *Methanosarcina acetivorans* was constructed.

30 [0066]

1. Construction of Vector

An Ma28-F1 primer shown in SEQ ID No: 37 and an Ma28-R1 primer shown in SEQ ID No: 38 were synthesized as primers for PCR based on the known base sequence of the MaFKBP28 gene shown in SEQ ID No: 17. Next, PCR was

carried out using the genomic DNA from *Methanosarcina*
acetivorans C2A (DSM2834) prepared in Example 3 as a
template and the Ma28-F1 primer and the Ma28-R1 primer as a
primer set to amplify the MaFKBP28.0 gene. The amplified
5 DNA fragments were confirmed to have the same base sequence
as the known base sequence of the MaFKBP28.0 gene. Here,
either an NcoI site derived from the 5'-end of the Ma28-F1
primer or an SpeI site derived from 3'-end of the Ma28-R1
primer was introduced at each terminal of the amplified DNA
10 fragments. Next, the MaFKBP28.0 gene and the double-strand
linker Throm were inserted at the NcoI/EcoRI site of the
pET21d plasmid DNA by following the same procedure as in
Example 1. Thus, an expression vector pMa28F2 was
constructed. The expression vector pMa28F2 contains the
15 same construction as that of the expression vector pMm18F2
shown in Fig. 2, but contains the MaFKBP28.0 gene instead
of the MmFKBP18.0 gene.

[Example 5]

[0067]

20 In the present Example, MaFKB17.8 was produced and
purified.

[0068]

1. Production of MaFKBP17.8

The expression vector pMa17F2 prepared in Example 3
25 was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) strain (manufactured
by Novagen) to obtain a transformant. An amount of 700 mL
of a 2 × YT medium (Yeast Extract 16 g/L, BACTO TRYPTON 20
g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.5) containing 100 µg/mL ampicillin
was prepared in a 2L Erlenmeyer flask. The medium was
30 inoculated with 2 to 3 platinum loops of the transformant,
and cultured under rotation (110 rpm) for 24 hours at 35°C.
After being cultured, the culture fluid was centrifuged
(10000 rpm × 10 min) to recover cells. The obtained cells
were suspended in 20 mL of a 25 mM HEPES buffer (pH 6.8)
35 containing 1 mM EDTA, and cryogenically preserved at -20°C.

[0069]

The frozen cell suspension was melted, and the cells were disrupted by sonication. The obtained fluid containing the disrupted cells was centrifuged to separate into a supernatant (soluble fraction) and a precipitating part (precipitate fraction). The precipitate fraction was suspended in a 25 mM HEPES/1 mM EDTA buffer (pH 6.8) containing 4% Triton X-100 and treated for 30 minutes to solubilize membrane components. Thereafter, the suspension was centrifuged to recover the precipitate. This procedure was repeated two times, and the resulting precipitate was suspended in a 20 mL of 25 mM HEPES/1 mM EDTA buffer (pH 6.8) to prepare an inclusion body fraction. Then, 10 μ g (5 μ L) of the soluble fraction and 5 μ L of the inclusion body fraction were subjected to SDS-PAGE, and the gel was dyed with Coomassie Brilliant Blue (CBB). Fig. 3 shows a photograph of the gel. In Fig. 3, the left lane represents the soluble fraction, and the right lane represents the precipitate fraction. The results show that the band corresponding to MaFKBP17.8 (indicated by an arrow) was detected only in the soluble fraction. Therefore, MaFKBP17.8 did not form the inclusion body, and was recovered in a soluble state.

[0070]

2. Purification of MaFKB17.8

Column-purification of the obtained soluble fraction was performed in an order of hydrophobic interaction chromatography and gel filtration to purify MaFKBP17.8 to almost homogeneity. Here, MaFKBP17.8 had already been purified to almost homogeneity after the hydrophobic interaction chromatography.

(a) Conditions of Hydrophobic Interaction Chromatography

Column: HighTrap Phenyl FF (volume: 5 mL,
manufactured by Amersham Biosciences)

Eluent

Solution A: 10 mM phosphate buffer (pH 6.8)
containing 500 mM ammonium sulfate

Solution B: 10 mM phosphate buffer (pH 6.8)

Eluting condition

5 0 to 50 minutes: linear gradient elution

50 to 70 minutes: isocratic elution

Flow rate: 3 mL/min

Column temperature: room temperature

(b) Conditions of Gel Filtration

10 Column: HiLoad 26/60 Superdex 200pg column (26 mm ×
60 cm; manufactured by Amersham Biosciences)

Eluent: 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0,
containing 0.15 M NaCl)

Eluting condition: isocratic elution

15 Flow rate: 3 mL/min

Column temperature: room temperature

[0071]

Next, PPIase activity of the purified MaFKBP17.8 was
evaluated as follows. The PPIase activity measurement was
20 carried out according to chymotrypsin coupling. Namely,
FKBP17.8 and a substrate peptide of PPIase, N-suc-Ala-Leu-
Pro-Phe-p-nitroanilide (Peptide Institute, Inc.) were added
to 2 mL of 100 mM phosphate buffer (pH 7.8) to give a final
concentration of 2.5 to 25 nM and 2 μ M, respectively, and
25 preincubated for 2 minutes at 15°C.

Next, chymotrypsin was added to give a final chymotrypsin
concentration of 2 μ M, and absorbance of the isolated p-
nitroanilide was measured to evaluate the PPIase activity.
The result shows that the PPIase activity (kcat/Km) of
30 MaFKBP17.8 was $3.34 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. This value was significantly
higher than the already reported PPIase activities of short
type FKBP-type PPIases derived from thermophilic and
hyperthermophilic archaebacteria, that is, the PPIase
activity of PPIase (MtFKBP17) derived from a thermophilic
35 archaebacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*: 0.38 s^{-1}

$1 \cdot \mu\text{M}^{-1}$, the PPIase activity of PPIase (TcFKBP18) derived from a hyperthermophilic archaeobacterum *Thermococcus* sp. KS-1: $0.35 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, and the PPIase activity of PPIase (MjFKBP18) derived from a hyperthermophilic archaeobacterum *Methanococcus jannaschii*: $0.92 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ (Ideno et al., Gene 2002 Jun 12; 292(1-2): 57-63).

[Examples 6 to 8]

omitted

10 [Example 9]

[0080]

In the present example, MaFKBP17.8 was confirmed to have molecular chaperone activity.

[0081]

15 Rhodanese was dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8) containing 6 M guanidine hydrochloride and 5 mM DTT to give a final rhodanese concentration of 63 μM . The solution was treated for 60 minutes at 25°C to denature rhodanese. The obtained denatured rhodanese was diluted 60
20 times in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8) containing 10 μM MaFKBP17.8 and 10 mM DTT and then treated for 45 minutes. After being treated, the activity of the refolded rhodanese was evaluated according to the Horowitz's method (Methods in Molecular Biology 40, 361-368 (1995)). The
25 refolded rhodanese activity was represented as a relative value to the activity of the native-type rhodanese that is set as 100%, and used as the molecular chaperone activity. The rhodanese activity of a solution in which MaFKBP17.8 was not added was measured as a control. Fig. 5 shows the
30 results. Although only about 5% of rhodanese was refolded without MaFKBP17.8, about 76% of rhodanese was refolded under the presence of MaFKBP17.8. Therefore, the results reveal that MaFKBP17.8 functions to refold denatured rhodanese to the native form.

35 [Example 10]

[0082]

In the present example, an expression vector that allows expression of a fusion protein of MaFKBP17.8 and rhodanese derived from a hyperthermophilic bacterium *Aeropyrum pernix* was constructed. In addition, a transformant containing the expression vector was produced. The transformant was cultured to obtain the fusion protein. Moreover, hydrophobic interaction chromatography was performed to purify the fusion protein from the culture. Furthermore, rhodanese was cleaved out from the purified fusion protein to obtain rhodanese as a native-type protein.

[0083]

1. Construction of Expression Vector and Production of Transformant

A genomic DNA was prepared by using a bacterial pellet of *Aeropyrum pernix* (JCM9820, same as DSM11879) obtained from Riken and following the same method as that used in Example 1. On the other hand, an ApTS-F1 primer shown in SEQ ID No: 25 and an ApTS-R1 primer shown in SEQ ID No: 26 were synthesized as primers for PCR based on the known base sequence of the rhodanese gene derived from *A. pernix* shown in SEQ ID No: 40. Next, PCR was carried out using the obtained genomic DNA as a template and the ApTS-F1 primer and ApTS-R1 primer as a primer set to amplify the rhodanese gene derived from *A. pernix*. The amplified DNA fragments were confirmed to have the same base sequence as the known base sequence of the rhodanese gene derived from *A. pernix*. Here, either an NdeI site derived from the 5'-end of the ApTS-F1 primer or an HindIII site derived from 3'-end of the ApTS-R1 primer was introduced at each end of the amplified DNA fragments. Next, the amplified DNA fragments containing the rhodanese gene derived from *A. pernix* were treated with NdeI/HindIII and inserted at the NdeI/HindIII site of the expression vector pMa17F2 constructed in Example 3. Thus, an expression vector that

allows expression of the fusion protein of MaFKBP17.8 and rhodanese derived from *A. pernix* was constructed. The expression vector contains the MaFKBP17.8 gene as a first coding region, the base sequence encoding the thrombin recognition amino acid sequence, and the gene encoding rhodanese derived from *A. pernix* as a second coding region downstream of the T-7 promoter in this order. Therefore, the expression vector allows expression of the fusion protein of MaFKBP17.8 and rhodanese derived from *A. pernix*.
(partially omitted)
[0084]

2. Production of Fusion Protein

The obtained transformant was cultured and recovered by following the same method as in Example 5. Thereafter, a soluble fraction and an inclusion body fraction were obtained from a fluid containing disrupted cells. The soluble fraction and the inclusion body fraction were subjected to SDS-PAGE, and the gel was dyed with CBB. Fig. 6(a) shows a photograph of the gel. The band corresponding to the fusion protein of MaFKBP17.8 and rhodanese derived from *A. pernix* (shown as "MaFKBP17.8-rho fusion protein" and indicated by an arrow in the figure) was detected in the soluble fraction. Therefore, the rhodanese derived from *A. pernix* in form of the fusion protein with the MaFKBP17.8 was synthesized in a soluble state and did not form the inclusion body.

[0085]

3. Purification of Fusion Protein

Column-purification of the obtained soluble fraction was performed in an order of hydrophobic interaction chromatography and gel filtration under the same conditions as those of Example 5 to purify the fusion protein of MaFKBP17.8 and rhodanese derived from *A. pernix*.

[0086]

4. Production of Rhodanese

An amount of 1U of thrombin was added per mg of the purified fusion protein and treated for 16 hours at 22°C. The reaction fluid was subjected to SDS-PAGE, and the gel was dyed with CBB. Fig. 6(b) shows a photograph of the gel. The left lane represents the sample before the addition of thrombin, and the right lane represents the sample after the addition of thrombin and the treatment. The results show that only the fusion protein of MaFKBP17.8 and rhodanese derived from *A. pernix* was detected in the sample before the thrombin addition. However, the fusion protein was not detected but a band corresponding to rhodanese and a band corresponding to MaFKBP17.8 were detected in the sample after the thrombin addition and the treatment. Therefore, the results reveal that the thrombin recognition site of the fusion protein of MaFKBP17.8 and rhodanese derived from *A. pernix* was cleaved and the rhodanese was cleaved out.

[0087]

In Comparative Example, the rhodanese gene derived from *A. pernix* alone was expressed as the following procedure. An NdeI/HindIII digestion product of the rhodanese gene derived from *A. pernix* prepared in Example 10 was inserted into a pET21a plasmid DNA having been treated with NdeI/HindIII in advance. Thus, an expression vector that allows expression of rhodanese derived from *A. pernix* alone was constructed. The obtained expression vector was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) strain to obtain a transformant. The obtained transformant was cultured and recovered by following the same method as in Example 4. Thereafter, a soluble fraction and an inclusion body fraction of the obtained fluid containing disrupted cells were subjected to SDS-PAGE, and the gel was dyed with CBB. Fig. 6(c) shows a photograph of the gel. The left lane represents the soluble fraction, and the right lane represents the inclusion body fraction. The results show

that the rhodanese derived from *A. pernix* (indicated by an arrow) was detected only in the inclusion body fraction, and hardly detected in the soluble fraction.

Therefore, the results reveal that rhodanese derived from *A. pernix* forms an inclusion body when being expressed alone in *E. coli*, but is synthesized in a soluble fraction when being included in the fusion protein with MaFKBP17.8. [Examples 11 to 15] omitted.

[Example 16]

[0105]

In the present example, an expression vector that allows expression of a fusion protein of MaFKBP28.0 and rhodanese derived from *A. pernix* was constructed. In addition, a transformant containing the expression vector was produced. The transformant was cultured to obtain the fusion protein.

[0106]

1. Construction of Expression Vector and Production of Transformant

The amplified DNA fragments containing the rhodanese gene derived from *A. pernix* prepared in Example 10 were treated with NdeI/HindIII and inserted at the NdeI/HindIII site of the expression vector pMa28F2 constructed in Example 4. Thus, an expression vector pMa28F2-rho that allows expression of the fusion protein of MaFKBP28.0 and rhodanese derived from *A. pernix* was constructed. The expression vector pMa28F2-rho contains the MaFKBP28.0 gene as a first coding region, the base sequence encoding the thrombin recognition amino acid sequence, and the gene encoding rhodanese derived from *A. pernix* as a second coding region downstream of the T-7 promoter in this order. Therefore, the expression vector allows expression of the fusion protein of MaFKBP28.0 and rhodanese derived from *A.*

pernix. The protein to be expressed contains the thrombin digestion amino acid sequence between MaFKBP28.0 and rhodanese derived from *A. pernix*. Next, the constructed expression vector pMa28F2-rho was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) strain to obtain a transformant.
[0107]

2. Production of Fusion Protein

The obtained transformant was cultured and recovered by following the same method as in Example 5. Thereafter, a soluble fraction and an inclusion body fraction were obtained from a fluid containing disrupted cells. The soluble fraction and the inclusion body fraction were subjected to SDS-PAGE by following the same procedure as in Example 5, and the gel was dyed with CBB. Fig. 7(b) shows a photograph of the gel. The band corresponding to the fusion protein of MaFKBP28.0 and rhodanese derived from *A. pernix* (shown as "MaFKBP28.0-rho fusion protein" and indicated by an arrow) was detected in the soluble fraction. Therefore, the rhodanese derived from *A. pernix* in form of the fusion protein with the MaFKBP28.0 was synthesized in a soluble state and did not form the inclusion body.

[Example 17]

omitted

[0113]

The table below shows the base sequences, the sites of the restriction enzymes and SEQ ID NOs of the primers for PCR.

JMB

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®



Three-dimensional Solution Structure of an Archaeal FKBP with a Dual Function of Peptidyl Prolyl *cis*–*trans* Isomerase and Chaperone-like Activities

Rintaro Suzuki^{1,2}, Koji Nagata^{1,3}, Fumiaki Yumoto¹, Masaru Kawakami¹
Nobuaki Nemoto⁴, Masahiro Furutani⁵, Kyoko Adachi²
Tadashi Maruyama² and Masaru Tanokura^{1*}

¹Department of Applied
Biological Chemistry
Graduate School of
Agricultural and Life Sciences
The University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku
Tokyo 113-8657, Japan

²Marine Biotechnology
Institute, Heita, Kamaishi
Iwate 026-0001, Japan

³Biotechnology Research Center
The University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku
Tokyo 113-8657, Japan

⁴Varian Technologies Japan Ltd.
Minato-ku, Tokyo 108-0023
Japan

⁵Sekisui Chemical Co. Ltd.
Minase Research Institute
Mishima-gun, Osaka 618-0021
Japan

Here we report the solution structure of an archaeal FK506-binding protein (FKBP) from a thermophilic archaeum, *Methanococcus thermolithotrophicus* (MtFKBP17), which has peptidyl prolyl *cis*–*trans* isomerase (PPIase) and chaperone-like activities, to reveal the structural basis for the dual function. In addition to a typical PPIase domain, a newly identified domain is formed in the flap loop by a 48-residue insert that is required for the chaperone-like activity. The new domain, called IF domain (the Insert in the Flap), is a novel-folding motif and exposes a hydrophobic surface, which we consider to play an important role in the chaperone-like activity.

© 2003 Published by Elsevier Science Ltd

*Corresponding author

Keywords: FKBP; peptidyl-prolyl *cis*–*trans* isomerase; chaperone; archaea; NMR structure determination

Introduction

Cis–*trans* isomerization of peptidyl prolyl bonds is one of the rate-limiting steps in protein folding.¹

Peptidyl prolyl *cis*–*trans* isomerase (PPIase, EC 5.2.1.8) catalyzes this step and accelerates protein folding.^{2,3} Three families of PPIases are known: cyclophilins, FK506-binding proteins (FKBPs), and

Present address: N. Nemoto, JEOL Ltd, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan.

Abbreviations used: EcTig48, *Escherichia coli* trigger factor (48 kDa); FKBP, FK506-binding protein; HsFKBP12, *Homo sapiens* (human) FKBP (12 kDa); HsFKBP25, *Homo sapiens* FKBP (25 kDa); HsPvn14, *Homo sapiens* parvulin-type PPIase (14 kDa; also called hPar14); HsPvn18, *Homo sapiens* parvulin-type PPIase with a WW domain (18 kDa; also called hPin1); MtFKBP17, *Methanococcus thermolithotrophicus* FKBP (17 kDa); IF domain, insert in the flap domain; LpFKBP25, *Legionella pneumophila* FKBP (25 kDa); MgTig51, *Mycoplasma genitalium* trigger factor (51 kDa); Mip, macrophage infectivity potentiator; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; OcFKBP52, *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) FKBP (52 kDa); PPIase, peptidyl prolyl *cis*–*trans* isomerase; Pvn, parvulin; RMS, root-mean-square; RMSD, root-mean-square deviation; ScFKBP12, *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) FKBP (12 kDa); SD, standard deviation; Sly, sensitivity to lysis; Tig, trigger factor.

E-mail address of the corresponding author: amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

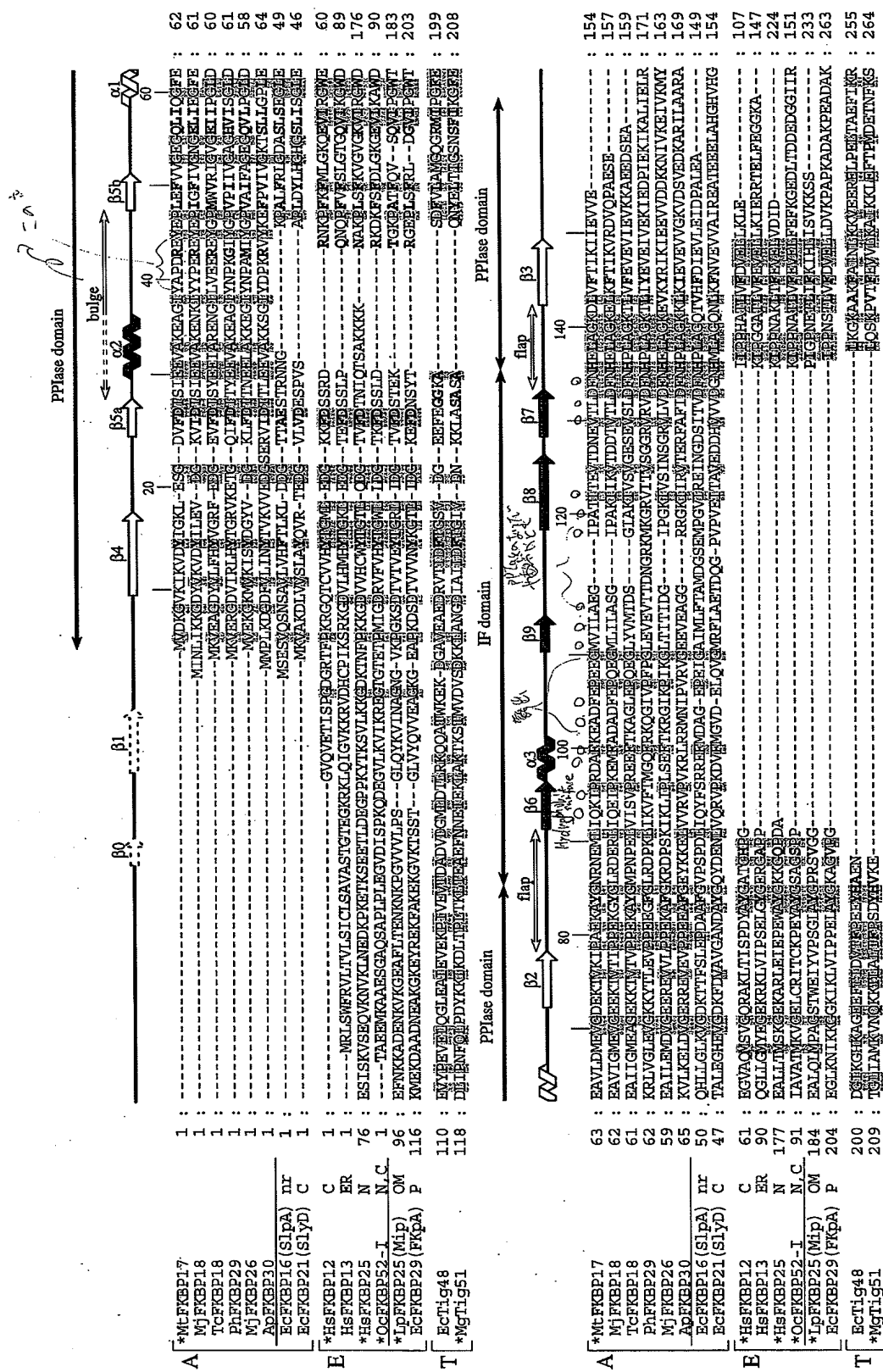


Figure 1. Structure-based sequence alignment of representative FKBP domains. Multiple alignments were carried out using Dialign2⁵⁷ and structure-based alignments were carried out using Swiss-PdbViewer v3.7b2.⁵⁸ Numbering, secondary structure elements, name of loops, and domain structures of MfFKBP17 are shown above the sequences. Secondary structure elements that are unique to MfFKBP17 are colored gray, while the others are white. Broken elements are not found in MfFKBP17. Archaeal/bacterial SlyD-type FKBP domains, eukaryotic/bacterial Mip-type FKBP domains, and trigger factors are designated as A, E, and T. Bacterial SlyD-type and Mip-type FKBP domains are shown at the bottom of each of the groups, separated by lines. Highly conserved residues within each group are separately shaded. Residues at or around the PPIase active site are shown in bold letters. Sequences are taken from the SwissProt and the TrEMBL databases. The first two letters of protein names represent the species: Mf, *M. thermophilus*; Tc, *Thermococcus*; Ap, *Archaeoglobus*; Hs, human; Oc, rabbit; Ec, *E. coli*; Lp, *L. pneumophila*; Mg, *M. genitalium*. The following letters represent the subfamily: FKBP, FK506 binding protein; Tr, trigger factor. Numbers in the end of the protein names represent molecular masses in kDa. Common names of the proteins are shown in parentheses. Subcellular localizations are shown for eukaryotic and bacterial FKBP domains: N, nucleus; C, cytoplasm; ER, endoplasmic reticulum; P, periplasm; OM, outer membrane; nr, not reported. Asterisks designate the FKBP domains that were used for structure-based alignments.

Table 1. Structural statistics

A. Experimental restraints	
(1) NOE-derived distance restraints	
Intraresidual ($ i - j = 0$)	729
Sequential ($ i - j = 1$)	713
Medium range ($2 \leq i - j \leq 5$)	660
Long range ($ i - j \leq 6$)	1179
(2) Dihedral angle restraints	
ϕ	39
χ_1	38
Hydrogen bond distance restraints	44
B. Deviations from the experimental restraints	
RMS distance restraint violation (Å)	0.026 ± 0.0008
Number of distance restraint violations > 0.5 Å	0
Number of distance restraint violations > 0.4 Å	2
RMS dihedral angle restraint violation ($^\circ$)	0.4 ± 0.08
Number of dihedral angle restraint violations $> 5^\circ$	0
Number of dihedral angle restraint violations $> 3^\circ$	2
C. Pair-wise atomic RMS deviations of the ten structures (Å)	
(1) PPIase domain ^a	
Backbone heavy atoms ^b	0.64 ± 0.10
All heavy atoms	1.09 ± 0.09
(2) IF domain ^c	
Backbone heavy atoms	0.59 ± 0.13
All heavy atoms	1.15 ± 0.12
D. Ramachandran analysis (%)^d	
Most favored region	60.7
Additionally allowed regions	35.2
Generously allowed regions	3.6
Disallowed regions	0.5

Ensemble of the ten lowest target function structures out of 100 calculated.

^a Residues 5–40, 45–85, and 136–153.

^b N, C α , and C β .

^c Residues 86–135.

^d From PROCHECK⁶¹ analysis of the ten structures.

parvulins.^{2,3} These three families have no sequence similarity to one another. With respect to tertiary structure, FKBP and the PPIase domain of parvulin resemble each other, but they do not resemble cyclophilin.^{4–6} Cyclophilins and FKBP are inhibited by the immunosuppressants, cyclosporin A and FK506, respectively.^{7,8} Parvulins are not inhibited by FK506^{9–11} despite their FKBP-like fold. Trigger factors, a group of bacterial PPIases that are involved in initial folding steps of nascent polypeptide chains,¹² show low sequence similarity to FKBP¹³ and adopt FKBP-like fold;¹⁴ thus, they are supposed to be a subfamily of FKBP. Unlike FKBP, trigger factors are not inhibited^{14,15} or very weakly inhibited¹⁶ by FK506. So far, numerous PPIases have been characterized and some PPIases with various additional functions such as protein trafficking, protein assembly, signal transduction, and cell cycle regulation have also been found.^{2,3}

PPIases are widely distributed and expressed abundantly in both eukarya and bacteria. For

example, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has seven cyclophilins, four FKBP, and a parvulin, and *Escherichia coli* has two cyclophilins, four FKBP, a trigger factor, and two parvulins.¹⁷ On the other hand, archaea have fewer kinds of PPIases than eukarya and bacteria.¹⁸ Genomic sequence analyses have revealed that most archaeal species do not have cyclophilins and parvulins. Only four cyclophilin genes have been found in 16 completely sequenced archaeal genomes^{19–22} and two other cyclophilins have been found in two archaea, *Halobacterium salinarum*²³ and *Ferroplasma acidarmanus*†. Parvulin from *Cenarchaeum symbiosum* is the only archaeal parvulin found so far.²⁴ In contrast, all archaeal species whose complete genomic sequences have been revealed have one or two FKBP. These facts imply that FKBP(s) play requisite roles as the only PPIase in most archaeal species.

FKBP from the thermophilic archaeum *M. thermolithotrophicus* (MtFKBP17) is the only protein that is known to have PPIase activity in this archaeum²⁵ and shows PPIase activity comparable to those of bacterial and eukaryotic FKBP, even at a temperature as low as 15 °C.^{25,26} In addition to the PPIase activity, MtFKBP17 shows chaperone-like activity, i.e. it protects other proteins from aggregation or wrong folding.²⁷ Its PPIase and chaperone-like activities are not correlated to each other; some mutations affect only the PPIase activity.²⁷ Other archaeal FKBP also exhibit both PPIase and chaperone-like activities.^{26,28,29} Some high molecular weight FKBP such as rabbit FKBP52 (OcFKBP52)³⁰ and *E. coli* trigger factor 48 (EcTig48)³¹ also show chaperone-like activity in addition to PPIase activity. But, unlike archaeal FKBP, OcFKBP52 and EcTig48 have additional domains in the upstream and downstream regions of the PPIase domain and their chaperone-like activity is exerted by a domain other than the PPIase domain.^{31,32} Archaeal FKBP have two characteristic insertion sequences when compared with eukaryotic and bacterial Mip (macrophage infectivity potentiator)-type FKBP. One is a long insert (41 to 49 residues long) in the “flap” loop, and the other is a short insert (12 or 13 residues long) in the “bulge” loop (Figure 1).¹⁸ The long insert is also found in bacterial SlyD (sensitivity to lysis)-type FKBP,^{33,34} whereas the short insert is unique to archaeal FKBP. The long insert is required for the chaperone-like activity of MtFKBP17,²⁷ while the function of the short insert remains unknown.

So far, 41 crystal and solution structures have been deposited in RCSB Protein Data Bank (PDB) for eukaryotic/bacterial Mip-type FKBP. However, none of them have either the two inserts or the domain for chaperone-like activity. We report here the first structure of an archaeal FKBP, MtFKBP17, which has two inserts and a dual

† <http://www.jgi.doe.gov/>

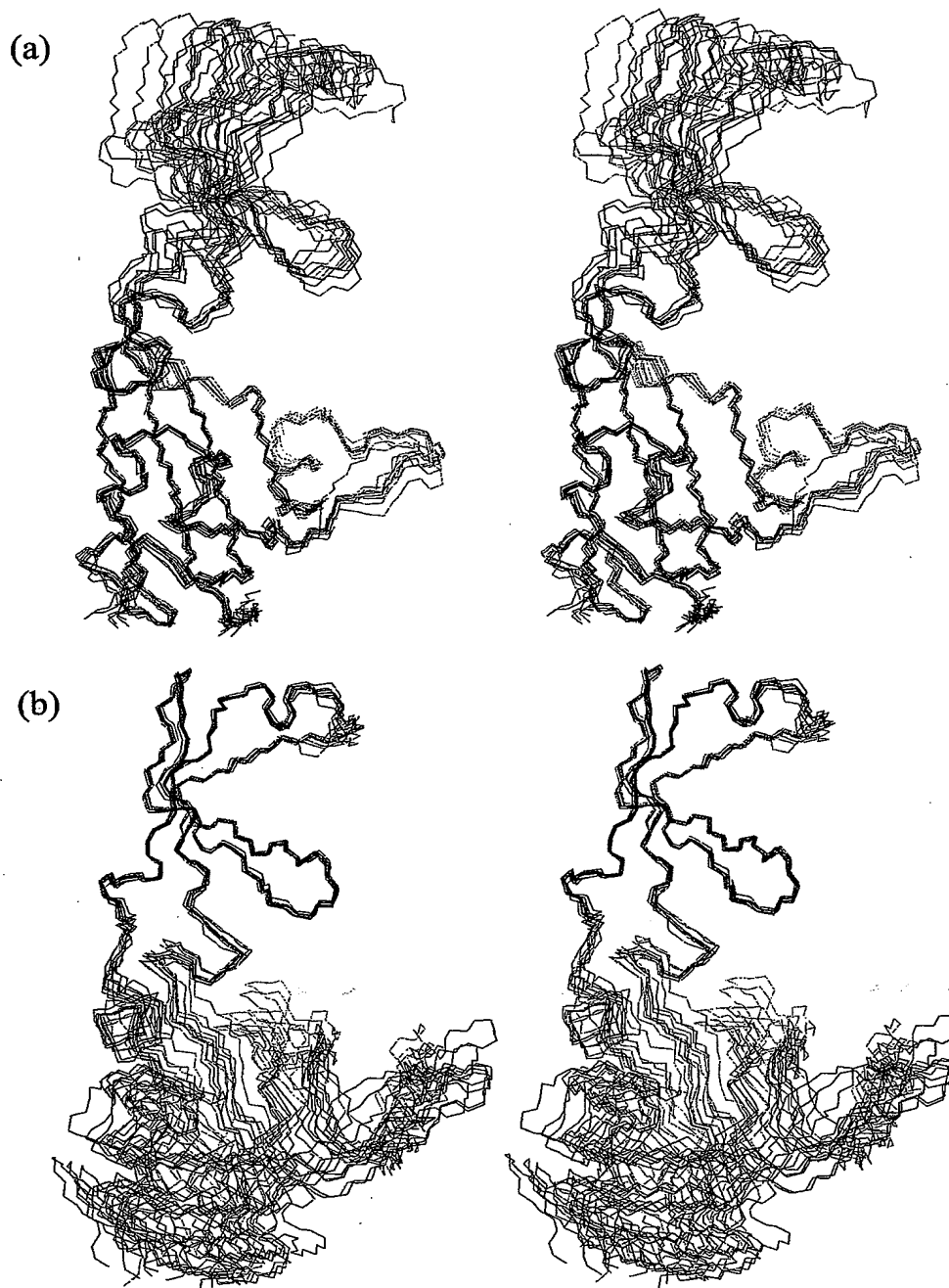


Figure 2. Stereo drawings of the ten NMR structures of the PPIase domain (a) and the IF domain (b) of MtFKBP17.

function of PPIase and chaperone-like activities. We then discuss the assignment of functional units to the determined structure.

Results and Discussion

Three-dimensional solution structure of MtFKBP17

The three-dimensional structure of MtFKBP17

was determined by heteronuclear multi-dimensional NMR spectroscopy based on a total of 3358 experimental distance and dihedral restraints. The assignment of resonances has been reported.³⁵ Structural statistics are summarized in Table 1.

An ensemble of ten structures shows that MtFKBP17 is composed of two domains (Figure 2). One is a typical PPIase domain of FKBP, which consists of 82 N-terminal and 19 C-terminal residues. The short insert in the bulge loop is included in the PPIase domain. The other domain is formed

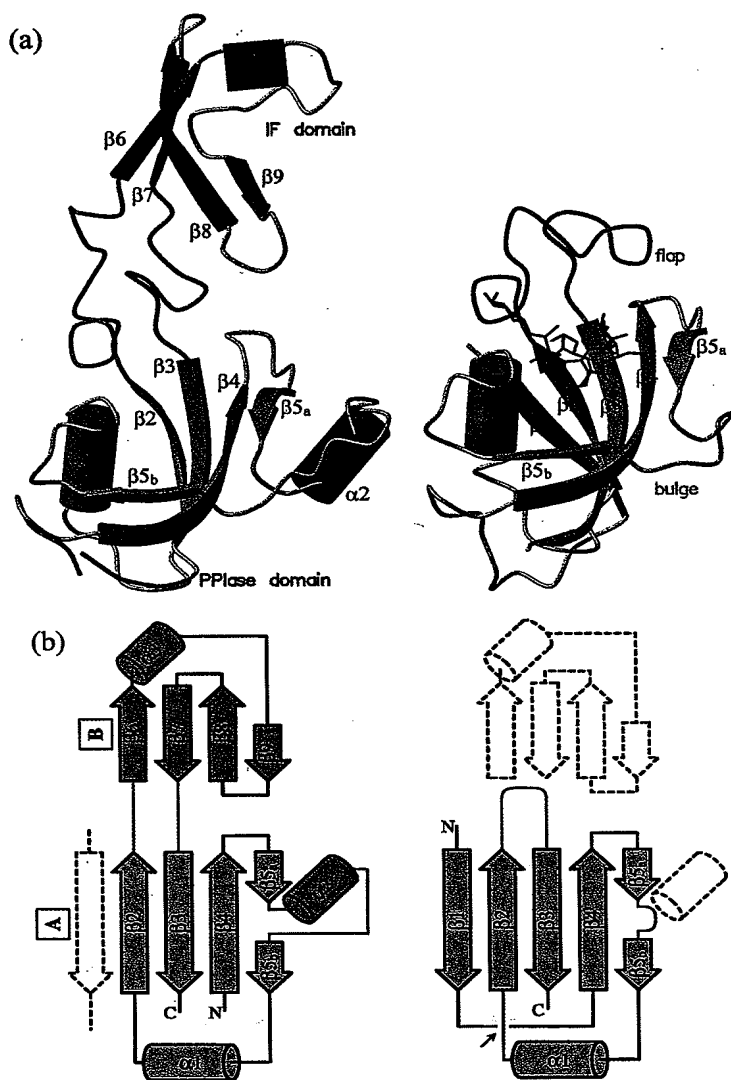


Figure 3. (a) Schematic models of MtFKBP17 (left) and HsFKBP12 (right). The secondary structure elements of HsFKBP12 and corresponding elements of MtFKBP17 are colored light blue, while the secondary structure elements unique to MtFKBP17 are colored red. The flap and bulge loops are colored green and yellow, respectively. FK506 bound to the active site of HsFKBP12 is shown in a stick model. The atomic coordinates of HsFKBP12 were obtained from PDB (1FKF). (b) Topological comparison of MtFKBP17 (left) and HsFKBP12 (right). The color scheme is the same as for (a). Secondary structural elements are labeled. β -Sheets A and B of MtFKBP17 are also indicated. Broken elements do not exist and are drawn for comparison. An arrow indicates the topological crossing of loops in HsFKBP12.

by the long insert (Asn86-Asn135) in the flap loop; this domain is named as IF (the Insert in the Flap) domain.

The relative orientation of the PPIase domain and the IF domain is less defined in our NMR structure (Figure 2). The segments that connect the two domains of MtFKBP17 (Pro79-Leu91 and Phe134-Asp142) correspond to the flap loop in HsFKBP12 (Figure 3), which is disordered in the unliganded state.^{36,37} The poor definition between the two domains in MtFKBP17 could be either due to the flexible linker or the insufficient number of experimental restraints used in our structure determination.

Structure of the PPIase domain

The PPIase domain of MtFKBP17 consists of a four-stranded antiparallel β -sheet (β -sheet A) accompanied by two α -helices (α 1, α 2) on both its sides (Figure 3(a)). It lacks an N-terminal β -strand (β 1) observed in human FKBP12 (HsFKBP12), one

of the most intensively studied FKBP.³⁸ The four-stranded β -sheet A and α 1-helix of the PPIase domain of MtFKBP17 have a topology of β 4- β 5- α 1- β 2- β 3 and correspond to the secondary structure of HsFKBP12, except for β 1-strand. The corresponding region is very similar; the root-mean-square (RMS) deviation is 1.2 Å for 78 C α atoms between MtFKBP17 and HsFKBP12 (Figure 4).

Due to the lack of β 1-strand, MtFKBP17 has no topological crossing of loops that is characteristic of eukaryotic/bacterial Mip-type FKBP (Figure 3(b)).^{38,39} Such a loop crossing in antiparallel β -sheet is a rarely observed, unfavorable folding element.⁴⁰ Thus, the lack of it would contribute to the stability of MtFKBP17.

A β 5-strand of MtFKBP17 is split into two strands, β 5_a and β 5_b, as in HsFKBP12. An α 2-helix, which is unique to MtFKBP17, is formed by a short insert in the bulge loop between β 5_a and β 5_b. The side-chains on α 2-helix form a hydrophobic cluster together with the side-chains on β 4



Figure 4. Overlay of the solution structure of MtFKBP17 and the crystal structure of HsFKBP12. The C α atoms used for superimposition are colored red and blue, while the other C α atoms are colored pink and light blue in MtFKBP17 and HsFKBP12, respectively.

and $\beta 5_a$ -strands (Figure 5). In contrast, $\beta 5_a$ -strand of HsFKBP12 is formed only when a ligand (ascomycin) is bound,⁴¹ otherwise it is disordered.^{36,37} Thus, $\alpha 2$ -helix of MtFKBP17 stabilizes the $\beta 5_a$ -strand even in the absence of a ligand and may enhance the thermostability of the protein.

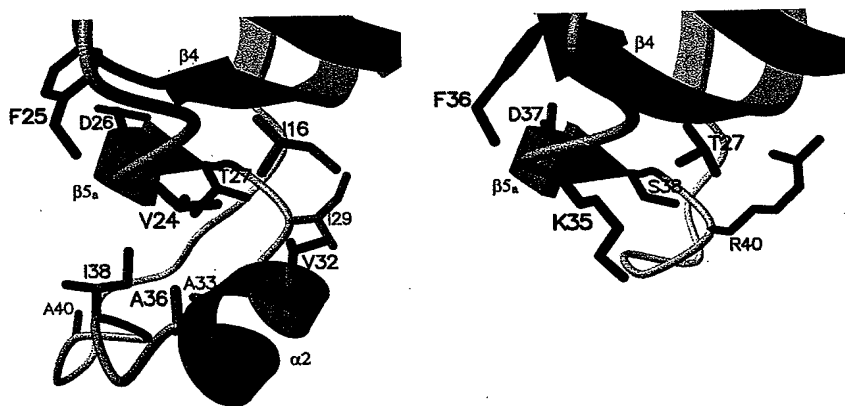


Figure 5. Minor hydrophobic cluster in the PPIase domain of MtFKBP17 (left) and the corresponding view of HsFKBP12 (right). Amino acid residues forming the cluster in MtFKBP17 and the corresponding residues in HsFKBP12 are shown in a stick model. Residues involved in the hydrophobic cluster are colored green. Hydrophilic residues Thr27, Lys35, Ser38, and Arg40 in HsFKBP12 are replaced by hydrophobic residues Ile16, Val24, Thr27, and Ile29 in MtFKBP17.

Structural comparison with other FKBP

The number of β -strands in a PPIase domain of FKBP varies from four to six. HsFKBP12 has a five-stranded β -sheet with a topology of $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 5_a$ - $\beta 5_b$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$.³⁸ Yeast FKBP12 (ScFKBP12),⁴² OcFKBP52,⁴³ and bacterial Mip-type FKBP from *Legionella pneumophila* (LpFKBP25)³⁹ have an extra β -strand (called $\beta 0$ here) at the N terminus with a topology of $\beta 0$ - $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 5_a$ - $\beta 5_b$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$ (Figure 6). On the other hand, human FKBP13 has a four-stranded β -sheet ($\beta 4$ - $\beta 5_a$ - $\beta 5_b$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$) and its 20 residue N-terminal segment corresponding to $\beta 1$ -strand does not appear in the electron density map.⁴⁴ The trigger factor from *Mycoplasma genitalium* (MgTig51) also has a four-stranded β -sheet, and its N-terminal segment corresponding to $\beta 1$ -strand is disordered in solution (Figure 6).¹⁴ MtFKBP17 also has a four-stranded β -sheet, and lacks $\beta 1$ -strand because of its shorter N terminus. Thus, a four-stranded β -sheet and an α -helix ($\beta 4$ - $\beta 5_a$ - $\beta 5_b$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$) would form a minimal structural frame required for the PPIase activity.

The variations within and around the flap and bulge loops confer various characters on the proteins with the FKBP-like fold (Figure 6). Archaeal FKBP have long and short inserts in the flap and bulge loops, respectively.¹⁸ Bacterial SlyD-type FKBP have a long insert in the flap loop.^{33,34} Human FKBP25 (HsFKBP25) has a nuclear localization signal in the bulge loop (Figure 6).⁴⁵ Trigger factors have shorter flap and bulge loops than those of HsFKBP12 by six and three amino acid residues, respectively.¹⁴ The human homologues of parvulin, hPin1 (HsPvn18) and hPar14 (HsPvn14), do not have the two loops;⁴⁻⁶ the flap loop is substituted by a turn, and the bulge region contains two α -helices instead of $\beta 5_a$ -strand observed in MtFKBP17 (Figure 6).

Active site of PPIase

In HsFKBP12, the substrate-binding pocket for the pipicolinyl ring of FK506 has been identified, which consists of Tyr26, Phe36; Asp37, Phe46, Phe48, Val55, Ile56, Trp59, Tyr82, Ile90, Ile91, Leu97, and Phe99 (Figure 7(a)).³⁸ In MtFKBP17,

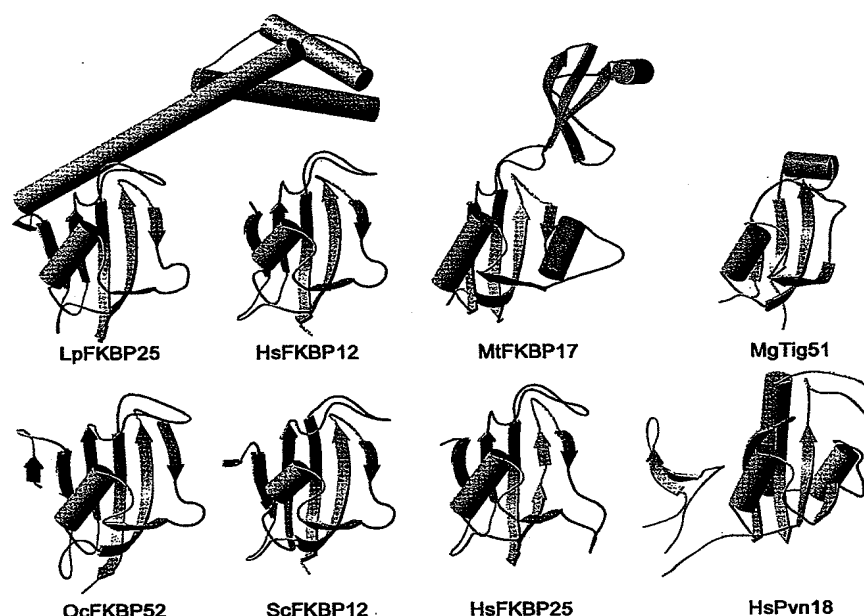


Figure 6. Structural comparison of proteins with the FKBP-like fold. The common secondary structure elements are colored yellow. β_0 and β_1 -strands are colored blue and red, respectively. The flap and bulge regions are colored light blue and green, respectively. The other structural elements, N-terminal dimerization domain of LpFKBP25, N-terminal WW domain of HsPvn18, and two α -helices between β_4 and β_{5b} of HsPvn18 are shown in gray. The names of proteins are abbreviated as for Figure 1. Atomic coordinates were obtained from the RCSB PDB: LpFKBP25, 1FD9; OcFKBP52, 1ROT; ScFKBP12, 1YAT; HsFKBP25, 1PBK; MgTig51, 1HXY; HsPvn18, 1PIN.

the corresponding residues form a similar hydrophobic pocket for substrate binding, which consists of Tyr15, Phe25, Asp26, Leu48, Phe50, Gln56, Leu57, Ile58, Phe61, Tyr84, Leu138, Leu143, and Phe145 (Figure 7(b)). The hydrophobic environment in the pocket would facilitate the rotation of a peptidyl prolyl bond by excluding water molecules.⁴⁶

The substrate-binding pocket of MtFKBP17 is more similar to that of MgTig51¹⁴ than that of HsFKBP12.³⁸ Firstly, Tyr84 in MtFKBP17 and Tyr230 in MgTig51 are shifted into the binding pockets when compared to the corresponding residue Tyr82 in HsFKBP12. Secondly, Leu57 in MtFKBP17 and Phe203 in MgTig51 protrude over the binding pocket, whereas the corresponding residue Val55 in HsFKBP12 is too small to protrude. Thirdly, Phe61 in MtFKBP17 and Phe207 in MgTig51, which lie at the bottom of the binding pocket, are replaced by Trp59 in HsFKBP12. All these differences make the substrate-binding pockets of MtFKBP17 and MgTig51 smaller than that of HsFKBP12, and alter the substrate specificity.

MtFKBP17 and EcTig48, the *E. coli* orthologue of MgTig51, catalyze the *cis-trans* isomerization of Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa and Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNa (called Ala^{P1} and Leu^{P1}, respectively, here) with similar efficiency; the ratio of the catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M values) for Leu^{P1} versus for Ala^{P1} is 1.75 for MtFKBP17²⁵ and 2.69 for EcTig48.¹⁵ In contrast, HsFKBP12 definitely prefers Leu^{P1} to Ala^{P1} with a ratio of 12.1.⁴⁷ Based on the proposition that the binding pocket of HsFKBP12 recognizes a substrate polypeptide at the Pro residue and its preceding residue at the P1 position,^{48,49} it can be explained that the small substrate-binding pockets of MtFKBP17 and MgTig51/EcTig48 would be able to fit both Leu and Ala at the P1

position (underlined in the sequences above), whereas the pocket of HsFKBP12 would be too big to fit Ala at P1. Since MtFKBP17 is the only protein that is known to have PPIase activity, in *M. thermolithotrophicus*,²⁵ its broader substrate acceptability would be suitable for its function.

Despite the similarity of their substrate-binding pockets in size and substrate preference, sensitivity to FK506 is different between MtFKBP17 and MgTig51/EcTig48. The PPIase activity of MtFKBP17 is inhibited by FK506,²⁵ whereas those of MgTig51 and EcTig48 are not.^{14,15} In the case of HsFKBP12, the carboxyl group of Asp37 on the β_{5a} -strand is shown to be important for binding to FK506,³⁸ and the substitution of this residue by Val decreases the affinity to FK506 dramatically.^{50,51} This Asp is conserved in almost all FKBP-like proteins, but is replaced by Ala and Glu in MgTig51 and EcTig48, respectively (Figure 1). Moreover, the backbone conformation around the β_{5a} -strand is quite different between MtFKBP17 and MgTig51. Therefore, the sensitivity to FK506 largely depends on the presence of this Asp residue rather than the size of the substrate-binding pocket as proposed by Vogtherr *et al.*¹⁴

Structure and functional implications of the IF domain

The IF domain consists of a four-stranded β -sheet (β -sheet B) and an α -helix (α_3) (Figure 8). No similar fold is found in the atomic coordinates deposited in the RCSB PDB by a search with the Dali program.⁵² Since a deletion mutant of MtFKBP17 which lacks the long insert forming the IF domain shows no chaperone-like activity, the IF domain is prerequisite to the chaperone-like activity of MtFKBP17.²⁷ Interestingly, the IF domain has a highly hydrophobic surface

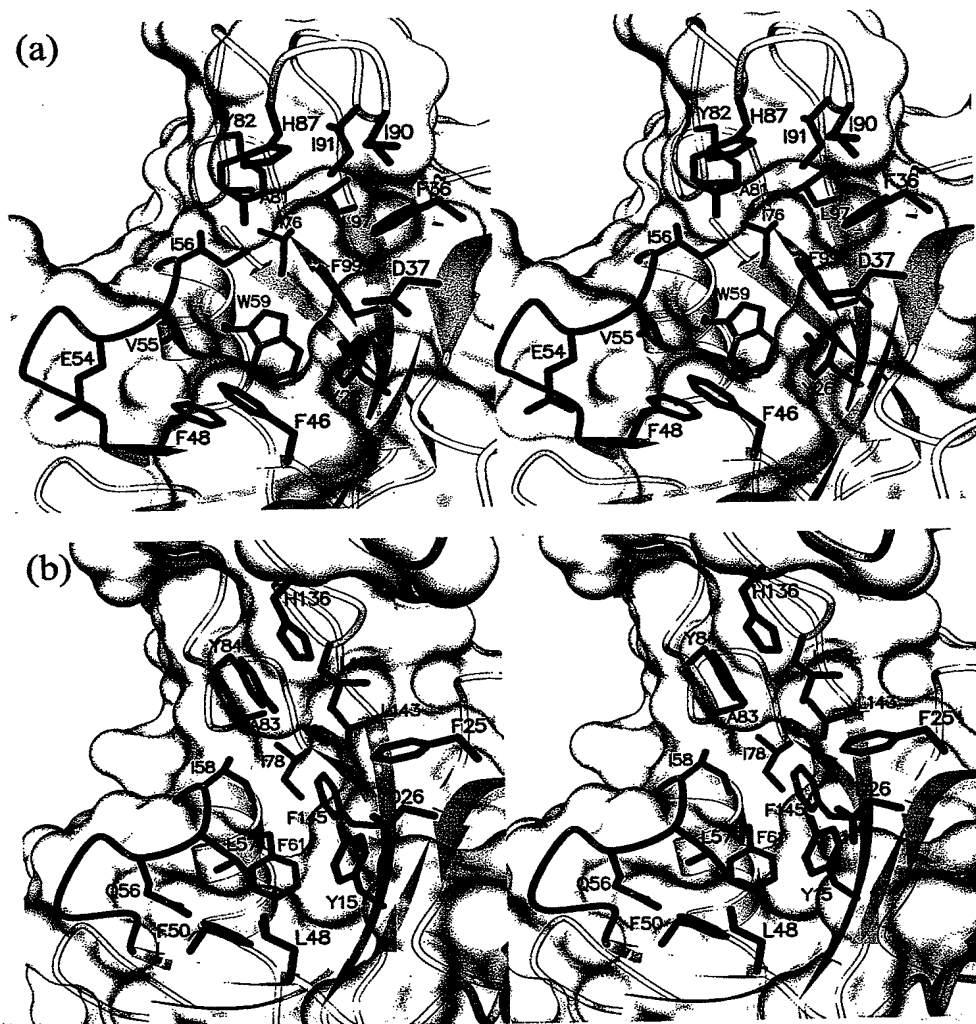


Figure 7. Substrate-binding pocket in the PPIase domain of (a) HsFKBP12 and (b) MtFKBP17. Different residues between MtFKBP17 and HsFKBP12 are colored violet. The loop between $\beta 5_b$ -strand and $\alpha 1$ -helix is colored orange.

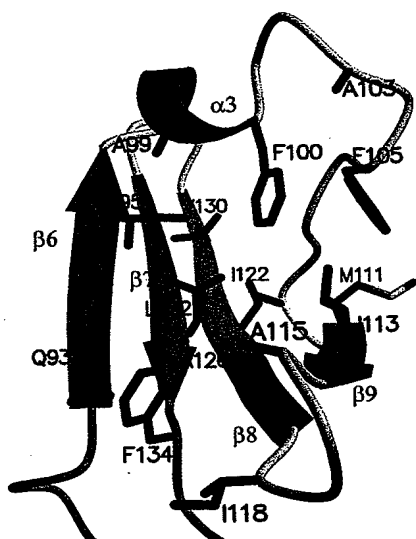


Figure 8. Hydrophobic surface of the IF domain of MtFKBP17. Amino acid residues forming the hydrophobic surface are shown and labeled.

(Figure 8), which probably binds and masks hydrophobic part(s) of a substrate polypeptide to prevent its aggregation, and, as a result, facilitates the correct folding of the substrate as the chaperones.^{53,54}

The molecular surface of MtFKBP17 is highly acidic except for the substrate-binding pocket of the PPIase domain and the hydrophobic surface of the IF domain, the probable active site for the chaperone-like activity (Figure 9). The solution structure suggests that the two domains of MtFKBP17 are discrete functional units for its PPIase and chaperone-like activities and that they work synergistically to assist folding of substrate polypeptide(s).

Conclusion

The solution structure of an archaeal FKBP from a thermophilic archaeum *M. thermolithotrophicus* (MtFKBP17) has been determined by triple-resonance three-dimensional NMR. This is the first



Figure 9. Distribution of charge (left) and hydrophobicity (right) on the surface of MtFKBP17. The electrostatic potential was calculated with GRASP.⁵⁹ Red, white, and blue correspond to negative, neutral, and positive potential, respectively. Hydrophobicity was evaluated with the hydropathic score of each residue;⁶⁰ green and white correspond to hydrophobic and hydrophilic residues, respectively. A speculative three-dimensional structure of a substrate peptide Ala₈-Pro-Phe-Ala₁₃ bound to MtFKBP17 is shown in a stick model.

report of the tertiary structure for an archaeal FKBP, which has a dual function of PPIase and chaperone-like activities. MtFKBP17 consists of two domains, a typical PPIase domain and a newly identified IF domain, which is formed within the flap loop by a 48 residue insert. The IF domain is required for the chaperone-like activity but not for the PPIase activity. The molecular surface of MtFKBP17 is highly acidic except for the substrate-binding pocket of the PPIase domain and the hydrophobic surface of the IF domain, the probable active site for the chaperone-like activity. The solution structure suggests that the two domains of MtFKBP17 are discrete functional units for its PPIase and chaperone-like activities and that they work synergistically to assist folding of substrate polypeptide(s).

Materials and Methods

NMR spectroscopy

Expression, purification, and NMR sample preparation of MtFKBP17 were done as described.^{27,35} All

spectra were acquired at 25 °C, pH 8.0, on Varian Unity-INOVA500 and UnityINOVA750 spectrometers. The assignment has been reported.³⁵ ¹⁵N and ¹³C-edited 3D NOESY spectra (75 ms mixing time) were used to obtain distance restraints for the structure calculations. 3D HNHA, 3D HNHB, and 3D HNCOHB spectra were used to obtain torsion angle restraints for ϕ and χ_1 .

Structure determination

NOE cross-peaks in ¹⁵N and ¹³C-edited 3D NOESY spectra were assigned using SPARKY 3 (T. D. Goddard & D. G. Kneller, University of California, San Francisco). The heights of NOE cross-peaks were calibrated using covalently fixed distances and translated to interproton distances based on the relation of $\text{NOE} \propto (\text{distance})^{-6}$. Restraints for the dihedral angle ϕ were derived from ³J_{HN-H α} coupling constants obtained from 3D HNHA. Dihedral angles χ_1 were restrained to 60°, 180° or -60° with a range of $\pm 50^\circ$ using 3D HNHB and 3D HNCOHB. Distance restraints for hydrogen bonds were set where slowly exchanging backbone amide protons were observed, $r_{\text{N-O}} = 2.7\text{--}3.5$ Å and $r_{\text{HN-O}} = 1.8\text{--}2.4$ Å. Structures were calculated by torsion angle dynamics using DYANA 1.4.⁵⁵ A set of 100 structures was calculated and a set of ten structures with the lowest values

in the target function was chosen to represent the ensemble. A structure that is closest to the mean structure of this ensemble was selected as the representative structure.

It has been proposed that the use of ^{13}C chemical shifts as structural restraints is an effective method for rapid protein structure determination when an insufficient number of experimental restraints are available.⁵⁶ However, it is an empirical method and is not always correct. Because the number of restraints was sufficient, we did not use ^{13}C chemical shift-derived restraints in our structure calculations of MtFKBP17.

Modeling of a substrate peptide bound to MtFKBP17

A speculative three-dimensional model of the substrate peptide Ala₈-Pro-Phe-Ala₁₃ bound to MtFKBP17 was modeled manually. First, the Pro-Phe segment, which fits into the substrate-binding pocket of the PPIase domain, was modeled based on the computer simulated model.^{48,49} Then, the other parts of the peptide (two poly(Ala) segments) were modeled so that the peptide fits on the hydrophobic surface of MtFKBP17. To avoid inappropriate values of the dihedral angles ψ and ϕ , an energy minimization was performed using the program Discover3 (Molecular Simulations Inc.).

Protein Data Bank accession codes

The coordinates have been deposited in the RCSB Protein Data Bank (accession code 1IX5).

Acknowledgements

This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research and the National Project on Protein Structural and Functional Analyses from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to *cis-trans* isomerism of proline residues. *Biochemistry*, **14**, 4953–4963.
- Schmid, F. X. (2001). Prolyl isomerases. *Advan. Protein Chem.* **59**, 243–282.
- Göthel, S. F. & Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 423–436.
- Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T. & Noel, J. P. (1997). Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell*, **89**, 875–886.
- Sekerina, E., Rahfeld, J. U., Müller, J., Fanghanel, J., Rascher, C., Fischer, G. & Bayer, P. (2000). NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. *J. Mol. Biol.* **301**, 1003–1017.
- Terada, T., Shirouzu, M., Fukumori, Y., Fujimori, F., Ito, Y., Kigawa, T. *et al.* (2001). Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase, hPar14. *J. Mol. Biol.* **305**, 917–926.
- Fruman, D. A., Burakoff, S. J. & Bierer, B. E. (1994). Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J.* **8**, 391–400.
- Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. (1992). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today*, **13**, 136–142.
- Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K. & Fischer, G. (1994). A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **343**, 65–69.
- Lu, K. P., Hanes, S. D. & Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature*, **380**, 544–547.
- Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, K. P., Grabley, S. *et al.* (1998). Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglone. *Biochemistry*, **37**, 5953–5960.
- Hesterkamp, T., Hauser, S., Lütcke, H. & Bukau, B. (1996). *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 4437–4441.
- Callebaut, I. & Morion, J. P. (1995). Trigger factor, one of the *Escherichia coli* chaperone proteins, is an original member of the FKBP family. *FEBS Letters*, **374**, 211–215.
- Vogtherr, M., Jacobs, D. M., Parac, T. N., Maurer, M., Pahl, A., Saxena, K. *et al.* (2002). NMR solution structure and dynamics of the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase domain of the trigger factor from *Mycoplasma genitalium* compared to FK506-binding protein. *J. Mol. Biol.* **318**, 1097–1115.
- Stoller, G., Rücknagel, K. P., Nierhaus, K. H., Schmid, F. X., Fischer, G. & Rahfeld, J. U. (1995). A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* **14**, 4939–4948.
- Göthel, S. F., Schmid, R., Wipat, A., Carter, N. M., Emmerson, P. T., Harwood, C. R. & Marahiel, M. A. (1997). An internal FK506-binding domain is the catalytic core of the prolyl isomerase activity associated with the *Bacillus subtilis* trigger factor. *Eur. J. Biochem.* **244**, 59–65.
- Pahl, A., Brune, K. & Bang, H. (1997). Fit for life? Evolution of chaperones and folding catalysts parallels the development of complex organisms. *Cell Stress Chaperones*, **2**, 78–86.
- Maruyama, T. & Furutani, M. (2000). Archaeal peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases (PPIases). *Front. Biosci.* **5**, d821–d836.
- Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T. *et al.* (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH : functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**, 7135–7155.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D. *et al.* (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 12176–12181.
- Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R. A., Martinez-Arias, R. *et al.* (2002). The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 453–461.
- Galagan, J. E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. G., Macdonald, P., FitzHugh, W. *et al.* (2002). The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* **12**, 532–542.
- Iida, T., Furutani, M., Iwabuchi, T. & Maruyama, T. (1997). Gene for a cyclophilin-type peptidyl-prolyl

- cis-trans* isomerase from a halophilic archaeon, *Halobacterium cutirubrum*. *Gene*, **204**, 139–144.
24. Schleper, C., DeLong, E. F., Preston, C. M., Feldman, R. A., Wu, K.-Y. & Swanson, R. V. (1998). Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* **180**, 5003–5009.
25. Furutani, M., Iida, T., Yamano, S., Kamino, K. & Maruyama, T. (1998). Biochemical and genetic characterization of an FK506-sensitive peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase from a thermophilic archaeon, *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J. Bacteriol.* **180**, 388–394.
26. Ideno, A., Yoshida, T., Furutani, M. & Maruyama, T. (2000). The 28.3 kDa FK506 binding protein from a thermophilic archaeon, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, protects the denaturation of proteins *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3139–3149.
27. Furutani, M., Ideno, A., Iida, T. & Maruyama, T. (2000). FK506 binding protein from a thermophilic archaeon, *Methanococcus thermolithotrophicus*, has chaperone-like activity *in vitro*. *Biochemistry*, **39**, 453–462.
28. Ideno, A., Yoshida, T., Iida, T., Furutani, M. & Maruyama, T. (2001). FK506-binding protein of the hyperthermophilic archaeum, *Thermococcus* sp. KS-1, a cold-shock-inducible peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase with activities to trap and refold denatured proteins. *Biochem. J.* **357**, 465–471.
29. Ideno, A., Furutani, M., Iba, Y., Kurosawa, Y. & Maruyama, T. (2002). FK506 binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* suppresses the aggregation of proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 464–469.
30. Bose, S., Weikl, T., Bügl, H. & Buchner, J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science*, **274**, 1715–1717.
31. Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G. & Schmid, F. X. (1997). Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. *EMBO J.* **16**, 54–58.
32. Pirkel, F., Fischer, E., Modrow, S. & Buchner, J. (2001). Localization of the chaperone domain of fkbp52. *J. Biol. Chem.* **276**, 37034–37041.
33. Wülfing, C., Lombardero, J. & Plückthun, A. (1994). An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.* **269**, 2895–2901.
34. Roof, W. D., Horne, S. M., Young, K. D. & Young, R. (1994). *slyD*, a host gene required for ϕ X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerases. *J. Biol. Chem.* **269**, 2902–2910.
35. Suzuki, R., Nagata, K., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K. *et al.* (2000). Assignment of ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonances of FKBP from *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J. Biomol. NMR*, **17**, 183–184.
36. Michnick, S. W., Rosen, M. K., Wandless, T. J., Karplus, M. & Schreiber, S. L. (1991). Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin. *Science*, **252**, 836–839.
37. Moore, J. M., Peattie, D. A., Fitzgibbon, M. J. & Thomson, J. A. (1991). Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506. *Nature*, **351**, 248–250.
38. Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Clardy, J. (1993). Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.* **229**, 105–124.
39. Riboldi-Tunncliffe, A., König, B., Jessen, S., Weiss, M. S., Rahfeld, J., Hacker, J. *et al.* (2001). Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. *Nature Struct. Biol.* **8**, 779–783.
40. Pitsyn, D. B. & Finkelstein, A. V. (1980). Similarities of protein topologies: evolutionary divergence, functional convergence or principles of folding? *Quart. Rev. Biophys.* **13**, 339–386.
41. Meadows, R. P., Nettesheim, D. G., Xu, R. X., Olejniczak, E. T., Petros, A. M., Holzman, T. F. *et al.* (1993). Three-dimensional structure of the FK506 binding protein/ascomycin complex in solution by heteronuclear three- and four-dimensional NMR. *Biochemistry*, **32**, 754–765.
42. Rotonda, J., Burbaum, J. J., Chan, H. K., Marcy, A. I. & Becker, J. W. (1993). Improved calcineurin inhibition by yeast FKBP12-drug complexes. Crystallographic and functional analysis. *J. Biol. Chem.* **268**, 7607–7609.
43. Craescu, C. T., Rouviere, N., Popescu, A., Cerpolini, E., Lebeau, M. C., Baulieu, E. E. & Mispelter, J. (1996). Three-dimensional structure of the immunophilin-like domain of FKBP59 in solution. *Biochemistry*, **35**, 11045–11052.
44. Schultz, L. W., Martin, P. K., Liang, J., Schreiber, S. L. & Clardy, J. (1994). Atomic structure of the immunophilin FKBP13-FK506 complex: insights into the composite binding surface for calcineurin. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3129–3130.
45. Liang, J., Hung, D. T., Schreiber, S. L. & Clardy, J. (1996). Structure of the human 25 kDa FK506 binding protein complexed with rapamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1231–1232.
46. Radzicka, A., Acheson, S. A. & Wolfenden, R. (1992). *cis/trans* isomerization at proline: desolvation and its consequences for protein folding. *Bioorg. Chem.* **20**, 382–386.
47. Harrison, R. K. & Stein, R. L. (1990). Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*, **29**, 3813–3816.
48. Fischer, S., Michnick, S. & Karplus, M. (1993). A mechanism for rotamase catalysis by the FK506 binding protein (FKBP). *Biochemistry*, **32**, 13830–13837.
49. Orozco, M., Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W. L. (1993). Mechanism for the rotamase activity of FK506 binding protein from molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, **32**, 12864–12874.
50. Aldape, R. A., Futer, O., DeCenzo, M. T., Jarrett, B. P., Murcko, M. A. & Livingston, D. J. (1992). Charged surface residues of FKBP12 participate in formation of the FKBP12-FK506-calcineurin complex. *J. Biol. Chem.* **267**, 16029–16032.
51. DeCenzo, M. T., Park, S. T., Jarrett, B. P., Aldape, R. A., Futer, O., Murcko, M. A. & Livingston, D. J. (1996). FK506-binding protein mutational analysis: defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes. *Protein Eng.* **9**, 173–180.
52. Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**, 123–138.
53. Ideno, A., Yoshida, T., Iida, T., Furutani, M. & Maruyama, T. (2001). FK506-binding protein of the

- hyperthermophilic archaeum *Thermococcus* sp. KS-1, a cold-shock-inducible peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase with activities to trap and refold denatured proteins. *Biochem. J.* 357, 465–471.
54. Ideno, A., Furutani, M., Iba, Y., Kurosawa, Y. & Maruyama, T. (2002). FK506 binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* suppresses the aggregation of proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 464–469.
55. Güntert, P., Mumenthaler, C. & Wüthrich, K. (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* 273, 283–298.
56. Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR*, 13, 289–302.
57. Morgenstern, B. (1999). DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics*, 15, 211–218.
58. Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714–2723.
59. Nicholls, A., Sharp, K. A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 11, 281–296.
60. Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
61. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR*, 8, 477–486.

Edited by P. Wright

(Received 30 October 2002; received in revised form 7 March 2003; accepted 17 March 2003)

ARCHAEAAL PEPTIDYL PROLYL CIS-TRANS ISOMERASES (PPIases)

Tadashi Maruyama¹ and Masahiro Furutani²

¹ Marine Biotechnology Institute, Kamaishi Laboratories, 3-75-1 Heita, Kamaishi-shi, Iwate 026-0001, Japan, ² Minase Research Institute, Sekisui Chemical Co. Ltd., 2-1, Hyakuyama, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8589, Japan

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Overview of PPIases
 - 2.1. History of PPIase discovery
 - 2.2. Three families of PPIase
 - 2.3. Mechanism of immunosuppression by cyclosporin A, FK506 and rapamycin
 - 2.4. Assay methods for PPIase activity
 - 2.5. PPIase in in vivo protein folding
 - 2.6. PPIase in in vitro protein folding
 - 2.7. Other functions of PPIases
3. Structure and Function of Archaeal PPIases
 - 3.1. PPIases in Archaea
 - 3.2. Structure of archaeal PPIases
 - 3.2.1. Cyclophilins in Archaea
 - 3.2.2. FKBP's in Archaea
 - 3.3. PPIase activity of archaeal FKBP's
 - 3.4. Chaperone-like activity of a short-type archaeal FKBP
 - 3.5. Deletion analysis of the short-type FKBP from *M. thermolithotrophicus*
 - 3.6. Is chaperone-like activity of MBTFKBP17 independent of PPIase activity?
 - 3.7. The long-type archaeal FKBP
4. Perspectives
5. Acknowledgements
6. References

1. ABSTRACT

PPIases are ubiquitous in living organisms. While 3 families of PPIases, cyclophilin (CyP), FK506 binding protein (FKBP) and parvulin (Pvn), have been studied in detail in Eukarya and Bacteria (eubacteria), little is known about archaeal PPIases. Among 2 cyclophilins found in Archaea, only *Halobacterium* cyclophilin (HcCyP19) has been characterized. It is a cyclosporin A (CsA) sensitive CyP with a MW of 19.4kDa. The PPIase activity and CsA sensitivity of this CyP is higher at higher salt concentration in the medium. No parvulin or its homolog has been found in Archaea. Two types of FKBP's, 26-30kDa long type and 17-18 kDa short type FKBP, have been found in Archaea. While the N-terminal regions of these 2 type FKBP's are similar to each other, the long type archaeal FKBP has an additional ca. 100 amino-acid sequence at its C-terminal region. In comparison with human HsFKBP12, the N-terminal region of the archaeal FKBP has 2 insertion sequences in the regions corresponding to Bulge and Flap of HsFKBP12. A short type archaeal FKBP from *Methanococcus thermolithotrophicus* has been shown to have not only a PPIase activity but also a chaperone like activity, which includes protein refolding and aggregation suppressing activities with regard to protein folding intermediates. Mutational analysis revealed that this chaperone-like activity was independent of the PPIase activity, and that the insertion sequence in the region corresponding to the Flap seemed to be important.

2. OVERVIEW OF PPIase

2.1. History of PPIase discovery

Among peptide bonds in the protein, rotation of prolyl imide bond is the slowest and is thought to be the rate-limiting step in the folding process of proteins. An enzyme which catalyses this slow rotation was found and called peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) (1). In 1989, porcine kidney PPIase was purified and its gene was cloned. It was shown to have the same amino-acid sequence with that of bovine cyclophilin (CyP), a target protein for an immunosuppressant, cyclosporin A (CsA) (2, 3). Soon after this discovery, a target protein for FK506 (FKBP: FK506 binding protein), a macrolide immunosuppressant, was also shown to be a PPIase, while amino-acid sequence homology between them was low (4). Another macrolide immunosuppressant, rapamycin (Rap) also binds to FKBP (5). In 1994, the third family of PPIase, parvulin (Pvn), was discovered in *Escherichia coli* (6). This PPIase has low homology to CyPs and FKBP's, and insensitive to either of CsA or FK506. The PPIase is also referred to as rotamase or protein foldase. Because CyPs and FKBP's bind the corresponding immunosuppressants, they are also called immunophilins. Various PPIases in these 3 families have been reported and characterized. Usually more than one gene in each of these families are found in eukaryotic and prokaryotic cells. Even a parasitic bacterium, *Mycoplasma genitalium*, with the smallest known genome of 0.58Mbp has a gene for a FKBP, trigger

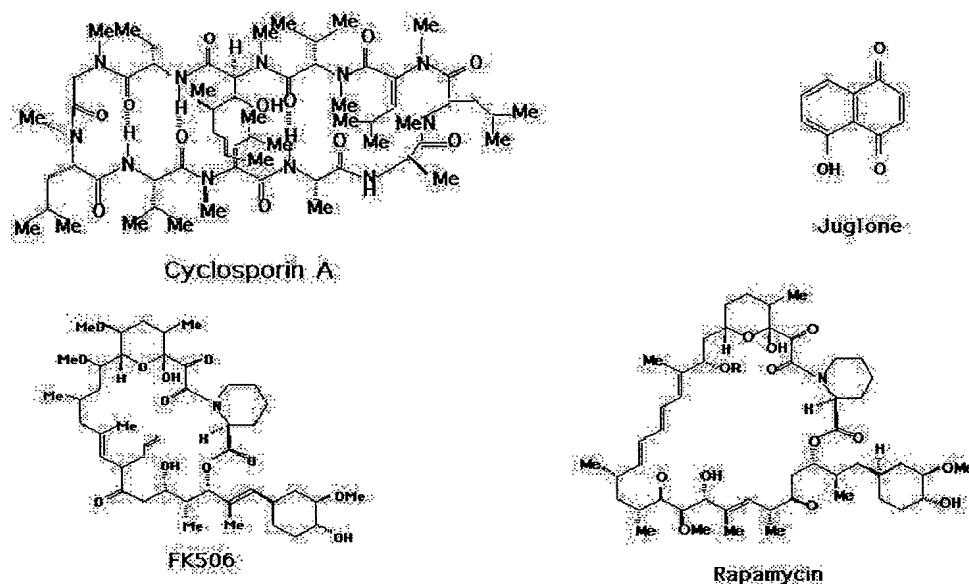


Figure 1. Chemical structures of PPIase inhibitors.

factor (7). These observations suggest that PPIase plays an essential role in the living cell. However, mutational analysis has revealed that in yeast all of the CyP and FKBP genes are dispensable, indicating that they are not essential for the growth (8). Function of PPIase is still enigmatic. While PPIases have been studied in Eukarya and Bacteria, little is known about PPIases in Archaea. Many members of Archaea live in extreme environments with high temperature, high salt concentration and/or extremely anaerobic conditions. Studies on archaeal PPIases may show the new function of PPIase in the life in extreme environments. Since a variety of PPIases have been reported with different names, it is useful to name them with species name, type of PPIase and molecular weight in kDa. For example, *E. coli* SlyD is called EcFKBP20 (*E. coli* FKBP with molecular weight of 20kDa).

2.2. Three families of PPIase

Three PPIase families have been reported. Cyclophilins (CyP) are PPIases sensitive to CsA (figure 1) or homologs to the prototype CyP, mammalian CyP18. The smallest human CyP is HsCyP18 with molecular weight of 18kDa (9) and the largest one is a giant nucleopore protein, HsCyP350 (Nup358 or nucleoporin), with molecular weight of 350kDa (10). Despite of the wide variety of their molecular weights, most of them have only one PPIase domain. Most of the small CyPs in Eukarya have high binding affinity to CsA; *i.e.*, IC_{50} of human CyP18 against CsA is approximately 6 nM (11). Bacterial CyPs have lower affinities for CsA; 2 CyPs from *E. coli* are insensitive to CsA (12) but *Bacillus subtilis* BsCyP17 is moderately sensitive (IC_{50} =120 nM) (13). Crystallographic analysis has revealed that human HsCyP18 has 8 antiparallel α -sheets with 2 short α -helices forming a β -barrel structure (14). 3D structure of human cyclophilin A (HsCyP18) is available in PDB (<http://pdb.protein.osaka-u.ac.jp/pdb/cgi/resultBrowser.cgi>) with ID of 2CPL.

Cyclophilins have been found in multicellular eukaryotes (animals and plants), unicellular eukaryotes, and bacteria except a parasitic bacterium with the smallest known genome, *M. genitalium* (7). Some viruses, such as HIV, contain the CyP of host cell in their virion which is important for starting reproduction after infection to the target cells (15). Large CyPs, which are involved in the interaction with various cellular components have modular structures to execute their function. Human HsCyP40, which is a component of heterocomplex of steroid receptor and hsp90, has three units of TPR (tetratricopeptide-repeat) domain and calmodulin binding motif at its C-terminus (16). The TPR is a degenerate 34 amino-acid motif involved in various protein-protein interactions and found in the three domains of living organisms, Eukarya, Bacteria and Archaea (17). The giant human HsCyP358 have a Leu rich region, eight Zn finger domains and RanBP (Ras related nuclear protein binding protein) homologous domains in addition to a cyclophilin domain (10).

PPIases with high binding affinity for FK506 and their homologous proteins are called FK506 binding protein (FKBP). The prototype of this group is human FKBP12 (HsFKBP12) (18). Three dimensional structure of HsFKBP12 has been resolved by X-ray crystallography (19) and NMR (20), and is available at PDB (<http://pdb.protein.osaka-u.ac.jp/pdb/cgi/resultBrowser.cgi>) with ID of 2FKE. It has five antiparallel β -strands wrapping around a short α -helix. Like large CyPs, large FKBP have modular structures but with multi-FKBP domains. HsFKB52 is a component of a heterocomplex of hsp90-steroid hormone receptor and has two FKBP-, three TPR- and a calmodulin binding-domains (21). An *E. coli* FKBP, Sly D (EcFKBP20), which is required for the sensitivity to a phage, phiX174, is inhibited by Ni^{2+} and is composed of two domains, a N-terminal FKBP domain and a His rich C-terminal domain (22).

Archaeal PPIases

Trigger factor (EcFKBP48) is a member of bacterial FKBP's but has low homology to other FKBP's without detectable binding affinity to FK506 or Rapamycin (23). It binds to the 50S ribosomal subunit and is thought to participate in folding of nascent proteins. Trigger factor has high PPIase activity and is composed of three domains, middle FKBP domain and flanking N- and C-terminal domains. While the truncated middle FKBP domain has high PPIase activity for short peptide substrates, both N- and C-terminal domains are required for high PPIase activity for protein substrates (24). Although the trigger factor itself is not essential for survival of *E. coli*, its depletion in the DnaK lacking mutant results in massive aggregation of cytosolic proteins (25). DnaK and trigger factor probably cooperate to promote proper folding of a variety of proteins in *E. coli*. Genes for the trigger factor or its homolog has been found in the genomes of two hyperthermophilic bacteria, *Aquifex aeolicus* (26) and *Thermotoga maritima* (27).

The third family of PPIase is the Parvulin (Pvn: from Parvulus, very small in Latin) family. The prototype of this family was found as the smallest *E. coli* PPIase with no significant homology with the other two families of PPIases (6). Parvulins have no affinity to the immunosuppressant, FK506 or CsA. Larger parvulins have been reported in Bacteria and Eukarya. SurA (EcPvn47) is a periplasmic *E. coli* parvulin with two parvulin domains which is thought to be involved in the folding of the outer membrane protein, porin (28). Eukaryotic members of this family, human Pin1 (HsPvn18) and yeast ESS1 (ScPvn19) are essential for cell cycle progression (29). Pin1/ESS1 and related larger parvulins have a WW domain, which contains 38-40 amino-acid residues in a triple-stranded antiparallel beta-sheet with two highly conserved tryptophans and functions as a phospho-Ser and phospho-Thr binding module in protein-protein interaction of the signal transduction (30). Recently a specific irreversible inhibitor, Juglone, has been reported for this family (31) (figure 1). Recent genome sequence analyses have revealed that hyperthermophilic bacteria, *Thermotoga maritima* and *Aquifex aeolicus* have two parvulin homologs in each of their genomes (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/COG/palog?BS_prsA).

2.3. Mechanism of immunosuppression by cyclosporin A, FK506 and rapamycin

Inhibition of PPIase activity is not important in the immunosuppressive action of CsA or FK506. Instead, the ligand-PPIase complexes act as inhibitors for signal transduction pathways in the immunological reactions. CsA-cyclophilin complex or FK506-FKBP complex binds and inhibits a protein phosphatase, calcineurin which is involved in the signal transduction to produce a T-cell growth factor, interleukin (IL)-2 (for review, see 32).

Interestingly, rapamycin (Rap) which also binds to FKBP mediates immunosuppression by a different mechanism. The Rap-FKBP complex binds to a protein kinase, TOR (Target of Rapamycin) in yeast or mTOR (mammalian TOR) (for review, see 33). This protein regulates the activity of p70S6 kinase, which is a key enzyme involved in cell-cycle signal transductions.

Consequently, the Rap-FKBP complex inhibit IL-2 stimulated growth of T-cells.

2.4. Assay methods for PPIase activity

A chymotrypsin (or trypsin) coupled assay method for PPIase activity was first invented by Fischer *et al.* in 1984 and is widely used (1, 34). Chymotrypsin cleaves only the *trans*-form of the Xaa-Pro bond amino acid (where Xaa is the preceding amino acid) of a small model peptide such as N-succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-*p*-nitroanilide. In aqueous solution, 90% of Xaa-Pro bond of this molecule is in *trans*-conformation. After addition of excess amount of α -chymotrypsin, the *trans* form of Xaa-Pro bond is cleaved instantaneously. The hydrolysis rate of the remaining 10% Xaa-Pro bond is limited by its *cis* to *trans* isomerization. Thus the *cis-trans* isomerization rate of the model peptide is measured by the release of *p*-nitroanilide by absorption spectroscopy.

A chymotrypsin-free spectrophotometric assay was developed by Janowski (35). In the mixture of trifluoroethanol and LiCl, the percentage of *cis* conformation of the Xaa-Pro bond of a small peptide N-succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-*p*-nitroanilide increases to 70%. After a solvent jump from this solution to aqueous buffer, *cis-trans* isomerization

A chymotrypsin-free spectrophotometric assay was developed by Janowski (35). In the mixture of trifluoroethanol and LiCl, the percentage of *cis* conformation of the Xaa-Pro bond of a small peptide N-succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-*p*-nitroanilide increases to 70%. After a solvent jump from this solution to aqueous buffer, *cis-trans* isomerization occurs. *Cis-trans* isomerization is measured by the small difference in absorbance between the *cis* and *trans* forms of the prolyl imide bond in the model peptide. This method is useful to detect the PPIase activity of yeast mitochondrial cyclophilin, Cyp19 (ScCyp20), whose rotamase activity cannot be measured by the conventional chymotrypsin coupled assay (36). NMR spectroscopy is also employed to directly measure the interconversion rate of *cis* and *trans* forms of peptides (37). If the conventional method does not work in some conditions, the other methods might help.

To study the PPIase activity in proteins, ribonuclease T1 (RNaseT1) is a suitable model, because it is completely refoldable and its refolding is rate-limited by prolyl isomerization (38). RNaseT1 is a small peptide of 104 amino acids containing two disulfide bonds (Cys2-Cys10 and Cys6-Cys103), and two *cis* (Tyr38-Pro39 and Ser54-Pro55) peptidyl prolyl bonds. The refolding of 8M urea-denatured RNaseT1 proceeds in a biphasic fashion because of these two *trans* to *cis* prolyl isomerizations. Mücke and Schmid (39, 40) improved this model protein by reduction of its two disulfide bonds and subsequent carboxymethylation. The resulting reduced and carboxymethylated (RCM)-RNaseT1 is unfolded in 0.1M Tris/HCl (pH8.0), and complete refolding is induced by the addition of 1-2 M NaCl. The RCM form of the S54G/P55N variant of RNaseT1 is a suitable substrate for studying PPIase activity in protein folding. Only a single *trans-cis*

Archaeal PPIases

isomerization of Pro39 is involved in its folding. This folding system does not require denaturants, such as guanidine hydrochloride or urea which often affect the activities of PPIases even at low concentration.

2.5. PPIase in *in vivo* protein folding

Although a yeast mutant lacking all the cyclophilins and FKBP has been shown to be viable (8), there has been ample evidence showing that PPIase is involved in protein folding *in vivo*. Cyclosporin A partially inhibits collagen triple-helix formation in chick embryo and human fibroblasts (41). A fruit fly mutant lacking the eye-specific *ninaA* (*DmCyp26*) gene has a defect in vision with reduced amount of rhodopsin (42). This cyclophilin was shown to form a complex with a rhodopsin, Rh1, *in vivo* (43). When the *Drosophila ninaA* gene was introduced into an insect cell line Sf9 and expressed, folding of a foreign protein expressed by recombinant baculovirus was improved (44). In *S. cerevisiae*, accumulation of unfolded protein in the endoplasmic reticulum (ER) induced upregulation of FKBP13 (45). A periplasmic parvulin of *E. coli*, Sur A (*EcPvn47*), was shown to be involved in the folding and assembly of outer membrane protein, porin (28).

In protein folding in living cells, PPIase may collaborate with other chaperones. PPIase is reported to enhance oxidative folding of RNaseT1 by protein disulfide isomerase (46). In mouse fibroblast ER and Golgi, CypB (*MmCyp20*) and Hsp47 form a complex with a newly synthesized procollagen I and are involved in its folding (47). In *E. coli* cells, trigger factor (*EcFKBP48*) cooperate with DnaK in nascent protein folding (25).

2.6. PPIase in *in vitro* protein folding

PPIases increase the refolding rate of RNase T1 and its reduced and carboxymethylated derivative RCM-RNaseT1, which are completely refoldable (24, 46, 48).

In addition to this PPIase activity, some PPIases have been suggested to have a chaperone-like activity which prevents aggregation of protein folding intermediates and increases the yield of refolded protein. Porcine kidney CyP (*SsCyp18*) and NK-TR (*HsCyp150*) have chaperone-like activity in addition to the PPIase activity (49, 50). Human CyP (*HsCyp18*), porcine *SsCyp18* and human *HsFKBP12* were reported to accelerate the speed of refolding of human carbonic anhydrase II but did not prevent its aggregation during refolding (51). Human *HsCyp18*, *HsFKBP12* and bovine serum albumin (BSA) were reported to increase the yield of refolding of antibody Fab fragment *in vitro* even in the presence of the inhibitor CsA (52). This suggested that this effect might be a result of nonspecific protein-protein interaction because they were insensitive to the inhibitor and because BSA also showed the similar effect. Human *HsFKBP52*, on the other hand, protects porcine heart citrate synthase from thermal aggregation in PPIase independent fashion (53). These somewhat contradictory results indicate that the chaperone-like activity of PPIase is still in question and remains to be studied in more detail.

2.7. Other functions of PPIases

At least one PPIase is found in any one of organisms so far studied. Large variety has been found in the PPIases so far reported. They are probably participated in various biological processes. Some of their possible functions are shown in table 1.

3. STRUCTURE AND FUNCTION OF ARCHAEOAL PPIASES

3.1. PPIases in Archaea

The domain Archaea includes microorganisms living under extreme conditions, hyperthermophiles, thermophiles, halophiles and methanogens. There is little available information of archaeal PPIases. A cyclophilin has been found only in a halophilic archaeum, *Halobacterium cutirubrum* (66, 67) and in the genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (68). No cyclophilin gene or its homolog has been found in complete genome sequences of hyperthermophilic archaea, *Methanococcus jannaschii* (69), *Archaeoglobus fulgidus* (70), *Pyrococcus horikoshii* (71) and *Aeropyrum pernix* (72), but one or two FKBP. Hyperthermophilic bacteria, *Thermotoga maritima* and *Aquifex aeolicus* which are phylogenetically closest to archaea, have a trigger factor and two parvulin homologs (26, 27). However, the gene for trigger factor or its homolog has not been found in archaeal genomes (68-72). Likewise, no gene for parvulin homolog has been found in reported archaeal genome sequences.

Several molecular chaperones, GroE, DnaK, DnaJ, and GrpE cooperate in the protein folding in the bacterial cytosol (73, 74). HSP70 (DnaK homolog) and HSP60 (GroEL homolog) cooperate in the protein folding in mitochondria (75). The genes encoding group II chaperonin (GroEL homolog) are found in all of the archaeal genomes studied. While genes encoding DnaK, DnaJ or GrpE, have been found in mesophilic (76) and some thermophilic archaea, such as *Methanobacterium thermoautotrophicum* (68), they have not been found in the genomes of hyperthermophilic archaea (69-72). Interestingly, the archaea which have Cyp gene also have a gene for HSP70 (67, 68, 76).

3.2. Structure of archaeal PPIases

3.2.1. Cyclophilins in archaea

A cyclophilin (CyP) was purified from a halophilic archaeum, *Halobacterium cutirubrum*. This cyclophilin (*HcCyp19*) was sensitive to cyclosporin A with the IC₅₀ value of 15nM in the presence of 2.9M KCl (66). While this is the only archaeal CyP characterized so far, a gene encoding a CyP-like protein has been found in the genome of a thermophilic archaeum, *M. thermoautotrophicum* (68) (table 2). The alignment of amino-acid sequences of *H. cutirubrum* and *M. thermoautotrophicum* CyPs with those of other eukaryotic and bacterial CyPs is shown in figure 2. The amino-acid sequence of *H. cutirubrum* CyP is 52.9% identical to that of MbtCyp15 and 40-45% to those of eukaryotes and *Bacillus subtilis* with high cyclosporin A-sensitivity, but 27% identical to those of cyclosporin A-insensitive CyPs from *Escherichia coli* (67). *HcCyp19* was reported to have a unique 23-amino-acids insertion sequence that showed no

Archaeal PPIases

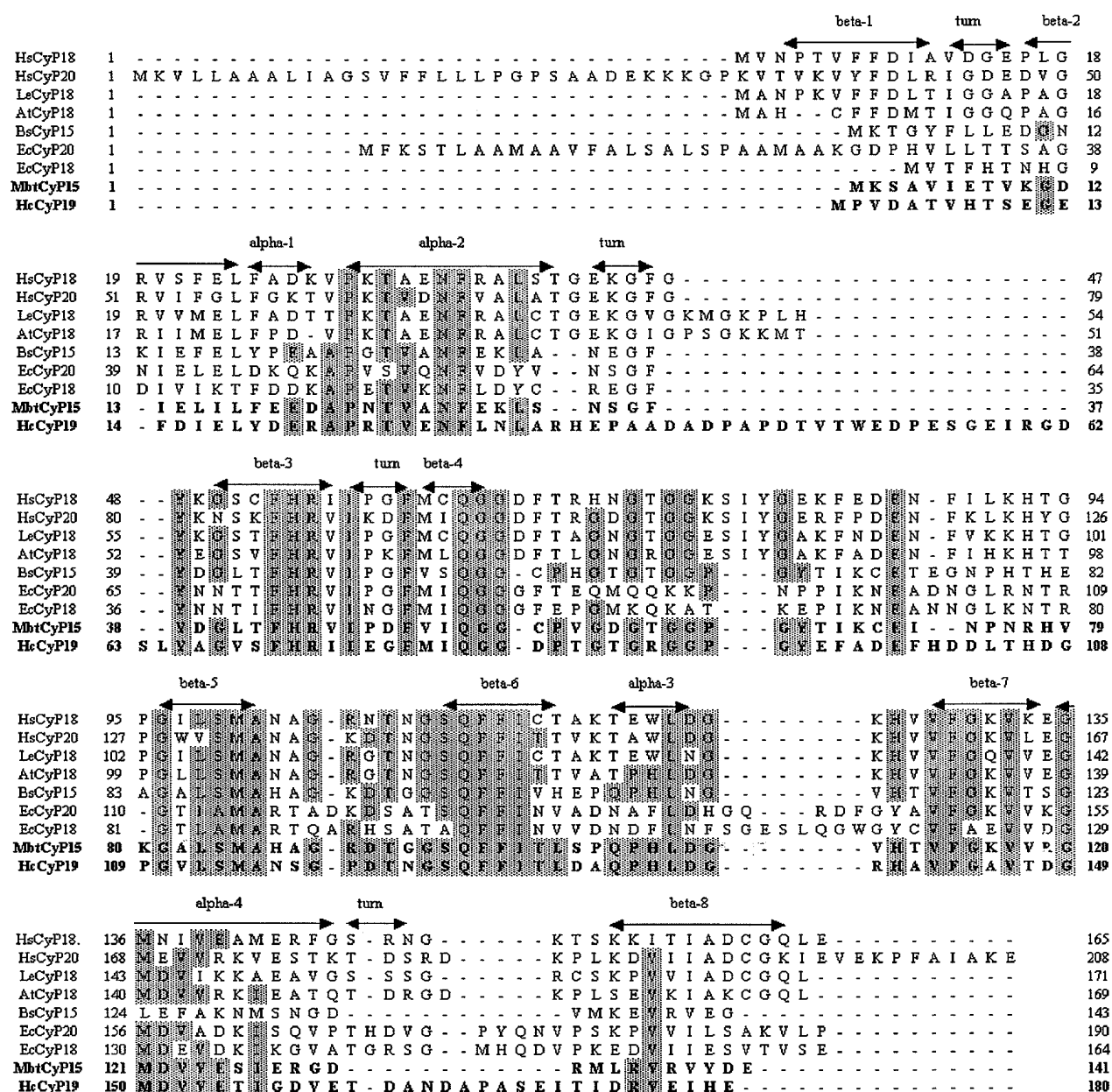


Figure 2. Alignment of archaeal CyP amino acid sequences with those of other bacterial and eukaryotic CyPs. Secondary structure reported for HsCyP18 is shown above the aligned sequences. alpha, alpha helix; beta, beta helix; tau, turn. Amino-acid residues common in archaeal CyPs are shadowed. Archaeal CyPs are shown in bold. Source of CyPs are; HsCyP18 (human); HsCyP20 (human); LeCyP18 (Tomato); AtCyP18 (*Arabidopsis thaliana*); BsCyP15 (*B. subtilis*); EcCyP20 (*E. coli*); EcCyP18 (*E. coli*); MbtCyP15 (*M. thermoautotrophicum*); HcCyP19 (*H. cutirubrum*)

Table 1. Possible functions of PPIases

Function	PPIase	Cells/Organisms	References
Cell cycle progression	Pin1/ESS1 (HsPar18/ScPar19)	Eukaryotic cells	29
Restoration of Alzheimer's disease associated phosphorylated tau to interact with microtubules	Pin 1 (HsPar18)	Human	54
Association with hormone receptors	FKBP52/CyP40	Mammals	55
Apoptosis	Cyclophilins A-C, D	Eukaryotic cells	56, 57
Mitochondrial membrane permeabilization to calcium ion	Cyclophilin D	Eukaryotic cells	57
Calcium ion release from sarcoplasmic reticulum	FKBP12	Mammals	58
Nuclease activity	Cyclophilins A-C	Eukaryotic cells	56
Nucleopore formation and protein transport to nucleus	RanBP2, Nup358	Mammals	10, 59
Protein synthesis and folding of nascent proteins	trigger factor	Bacteria	23, 25
Virulence factor in pathogenic bacteria	MIP ^a	Pathogenic bacteria	60, 61
Possible involvement in parasitism	Cyclophilins	Parasites	62
Virus particle formation and virulence in virus	Cyclophilin A	Virus	63
Nerve regeneration	FKBP52	Mammals	64
Protection against oxidative stress	Cyclophilin A	Mammalian cells	65
Vision (correct folding of rhodopsin)	NinaA (DmCyP26)	Fruit fly	42

^a, macrophage infectivity potentiator

Table 2. Cyclophilins in Archaea

CyPs	Sources	AA ^a	MW(kDa) ^b	PI ^b	IC50	References
HcCyP19	<i>Halobacterium cutirubrum</i>	180	19.4	3.9	15 nM (at 2.9 M KCl), 140 nM (at 1.4 M KCl)	66, 67
MbtCyP15	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	141	15.4	5.4	ND ^c	68

^a, amino acid residues; ^b, calculated using Genetyx-Mac v. 8.0 (Software Development Co.); ^c, not determined

homology to other CyPs from bacteria and eukaryotes (67). However, this insertion sequence is not found in *Methanobacterium thermoautotrophicum* CyP (MbtCyP15). It may be involved in halotolerance of *H. cutirubrum* CyP. While amino-acid sequence homology between MbtCyP15 and HcCyP19 is higher than those between

HcCyP19 and other CyPs, further investigation about archaeal cyclophilins are necessary to determine whether there are distinctive feature of archaeal cyclophilins.

3.2.2. FKBP in archaea

The short-type and the long-type FKBP have been reported from Archaea. The molecular masses are approximately 17-18 and 26-30 kDa, respectively (68-72, 77, 78) (table 3). While both a short-type and a long-type archaeal FKBP genes have been found in the genome of *Methanococcus jannaschii* (69), only one FKBP gene encoding a long-type FKBP was found in the genomes of *M. thermoautotrophicum* (68), *A. fulgidus* (70), *P. horikoshii* (71), and *Aeropyrum pernix* (72). We isolated genes encoding a short-type FKBP from *Methanococcus thermolithotrophicus* (77) and *Thermococcus* sp. KS-1 (78). It is not clear whether they have the long-type FKBP, or not. The alignment of the amino-acid sequences of archaeal FKBP with those of eukaryotic and bacterial FKBP are shown in figure 3. The alignment shows that the archaeal short-type FKBP has a FKBP domain, and the archaeal long-type FKBP has a FKBP domain with a 100-amino-acids surplus region at the C-terminus. The

secondary structures of human FKBP 12 kDa (HsFKBP12) are arranged in the order: (N-terminus)-beta-1-beta-4-beta-5-alpha-beta-2-beta-3-(C-terminus). Between beta-2 and beta-3, a surface loop called "flap" exists, and in the middle of beta-5, an intervening sequence called "bulge" splits beta-5 into two (79). The alignment analysis revealed that the archaeal FKBP domain (short-type FKBP) has a 13-amino acids insertion sequence in the bulge region of hFKBP12, and a 44-amino acids insertion sequence in flap region of hFKBP12. *E. coli* slyD (EcFKBP20) also has insertion sequence homologous to the archaeal 44 amino acids-insertion in the flap region (figure 3). Figure 4 shows the 3-D structure of HsFKBP12 with positions of the insertions.

Two consensus amino-acid sequence motifs for FKBP are found in PROSITE database (<http://www.expasy.ch/prosite/>). In the amino-acid sequences of long-type archaeal FKBP, and the 2 short-type FKBP, TcFKBP18 and MjFKBP18, one of these motifs, [LIVMFY]-X(2)-[GA]-X(3,4)-[LIVMF]-X(2)-[LIVMFHK]-X(2)-G-X(4)-[LIVMF]-X(3)-[PSGAQ]-X(2)-[AG]-[FY]-G (accession no. PS00454) is found, whereas the other motif, [LIVMC]-X-[YF]-X-[GVL]-X(1,2)-[LET]-X(2)-G-X(3)-[DE]-[STAEQK]-[STAN] (accession no. PS00453) is not. They are not found in *Escherichia coli* trigger factor (ecTIG: EcFKBP48) but both of them are found in a short type archaeal FKBP, MjFKBP17 (MTFK), *E. coli* SlyD (EcFKBP20), and HsFKBP12.

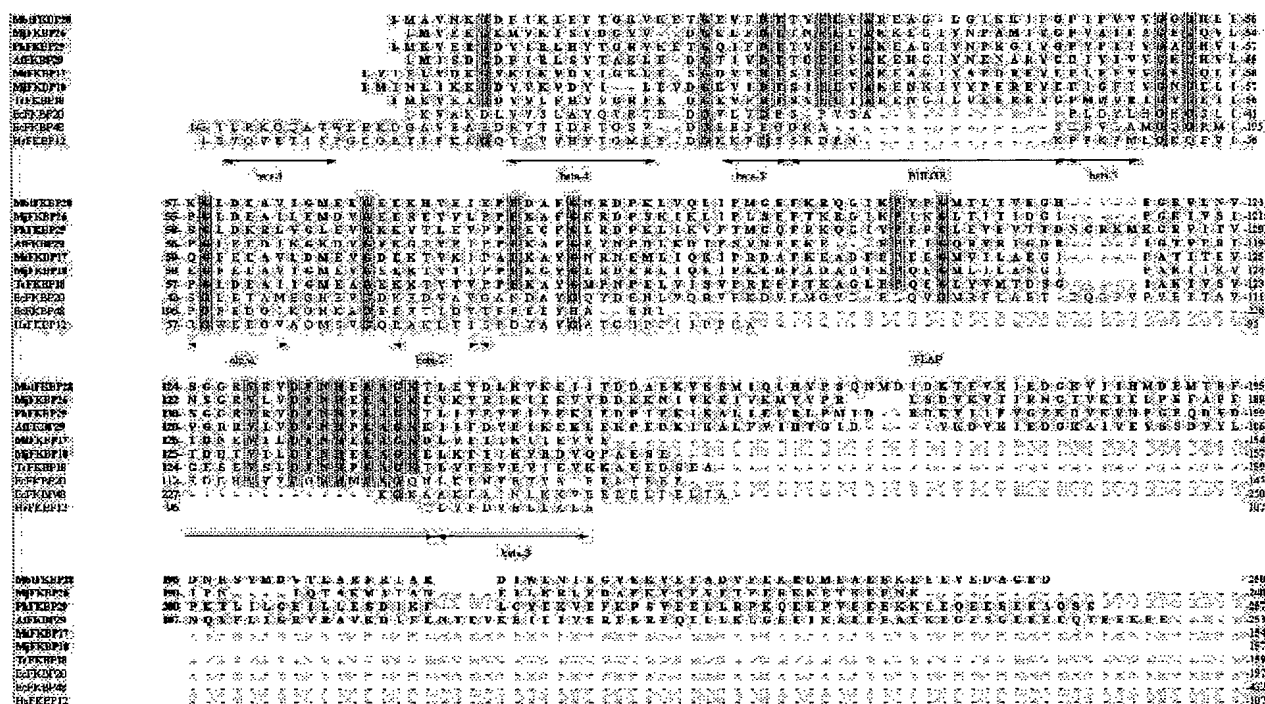


Figure 3. Alignment of archaeal FKBP amino acid sequences with those of other bacterial and eukaryotic FKBP. Amino-acid residues common in archaeal FKBP are shaded. Archaeal FKBP are shown in bold. Amino-acid residues common in archaeal FKBP are shaded. For the abbreviations for archaeal FKBP, see table 3. EcFKBP20, *E. coli* slyD; EcFKBP48, *E. coli* trigger factor; HsFKBP12, human FKBP12. Secondary structure of HsFKBP12 is shown below the alignments.

Table 3. FKBP from Archaea

FKBPs	Sources	AA ^a	MW(kDa)	PI ^b	IC50	Reference
MtFKBP17 (MTFK)	<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	154	17.2	4.1	250 nM	76
MjFKBP18 (MjFKBP-1)	<i>Methanococcus jannaschii</i>	157	17.7	4.3	NR ^c	69
TcFKBP18 (TCFK)	<i>Thermococcus</i> sp. KS1	159	17.6	4.2	NR ^c	77
MjFKBP26 (MjFKBP-2)	<i>Methanococcus jannaschii</i>	231	25.9	7.5	NR ^c	69
MbFKBP28 (MbFK)	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	250	28.3	4.5	NR ^c	68
AfFKBP29	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	253	29.0	4.5	NR ^c	70
ApFKBP30	<i>Aeropyrum pernix</i>	268	29.6	4.8	NR ^c	72
PhFKBP29	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	257	29.0	4.9	NR ^c	71
PfFKBP29	<i>P. furiosus</i>	258	29.1	4.9	NR ^c	Website ^d
PaFKBP30	<i>P. abyssi</i>	266	30.0	5.0	NR ^c	CAB49667 ^e

^a, amino acid residues; ^b, calculated by using Genetyx v. 8.0; ^c, not reported; ^d, <http://combdna.umbi.umd.edu/bags.html>; ^e, accession number in GenBank, EMBL and DDBJ

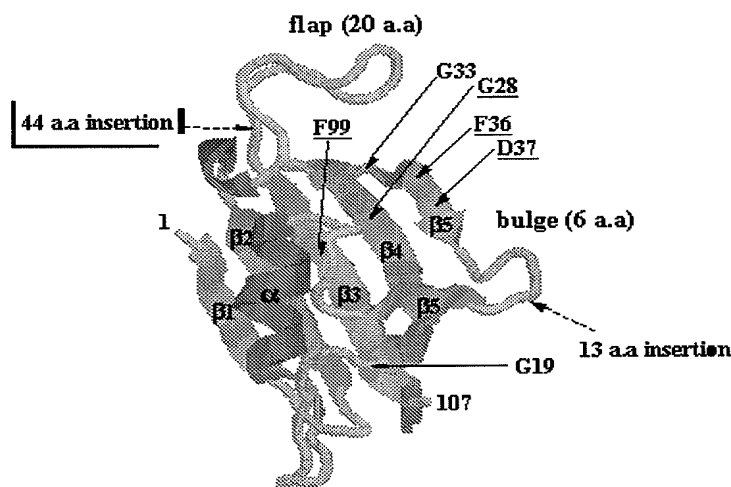


Figure 4. Three dimensional structure of human HsFKBP12 showing the positions of insertion sequences found in MtFKBP17. Positions of amino-acid substitutions in MtFKBP17 mutants are also shown. FK-dB is a deletion mutant lacking the insertion sequence in the region of bulge. FK-dF is the deletion mutant lacking the insertion sequence in the flap region and FK-dBF is the deletion mutant lacking both of these insertion sequences (84).

Table 4. Catalytic efficiencies of PPIases against N-suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-p-nitroanilide (K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)^a

Xaa	FKBPs			CyPs			
	<i>Methanococcus</i> <i>MtFKBP17</i>	<i>Thermococcus</i> <i>TcFKBP18</i>	<i>Methanobacterium</i> <i>MbtFKBP28</i>	<i>Escherichia</i> <i>trigger factor</i>	<i>Bovine</i> <i>BtFKBP</i>	<i>Escherichia</i> <i>EcCyP18</i>	<i>Bovine</i> <i>BtCyP</i>
Leu	350	350	0.74	430	640	23400	2700
Ala	200	290	0.4	160	50	67400	3180
Leu/Ala ^b	1.75	1.21	1.85	2.69	12.8	0.35	0.71
Reference	76	77	82	23	79	80	79

^a, PPIase activities were measured by the chymotrypsin-coupled assay at 10 or 15°C ^b, Ratio of K_{cat}/K_m for N-suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA to that for N-suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

3.3. PPIase activity of archaeal FKBP

The PPIase activities of archaeal FKBP and other PPIases against tetrapeptide substrate are shown in table 4. The catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) for N-succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA of MTFK (MtFKBP17) and that of TcFK (TcFKBP18) are 350 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (77, 78). These values are similar to those of *E. coli* trigger factor (430 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) (23) and bovine FKBP (640 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) (80), and significantly lower than those of *E. coli* CyP18 (23400 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) (81) and bovine CyP (2700 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) (80). The PPIase activities of MtFKBP17 and TcFKBP18 are inhibited by FK506 with IC_{50} values of 250 nM and 7microM, respectively (77, 78).

A long-type archaeal FKBP, MbtFKBP28 (MbFK) from *M. thermoautotrophicum*, was shown to have a weak PPIase activity (table 4), which was insensitive to FK506 (82). Another long-type FKBP, AaFKBP29 from a hyperthermophilic sulfate reducer, *A. fulgidus*, also exhibited little PPIase activity (Ideno et al. unpublished data). One of two consensus FKBP motifs in PROSITE database (see section II-2) is not found in the protein sequence of MbtFKBP28. The substitution of F99 with Y in human HsFKBP12 (83), and the corresponding substitutions in *E. coli* trigger factor (EcFKBP48) (83), and

in MtFKBP17 (84), significantly reduce their PPIase activities. In the protein sequences of MbtFKBP28 and other archaeal long-type FKBP, the residues corresponding to F99 in HsFKBP12 is substituted with Y (figure 2). This may be the cause of low PPIase activity in MbtFKBP28.

Generally, cyclophilins prefer N-suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA to N-suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA, while the reverse is true for FKBP (table 4). The Leu/Ala values, the ratio of k_{cat}/K_m for N-suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA versus that for N-suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, of thermophilic archaeal FKBP are 1.2 to 1.85, respectively, while those of other FKBP are 2.69 to 22.0 (table 4). This may indicate that archaeal FKBP have low substrate specificity.

At higher temperature, it is expected that the spontaneous rotation rate of peptidyl-prolyl imide bond increases. With increasing temperature (15-35°C), the difference between the rate constant of spontaneous peptidyl-prolyl isomerization of tetrapeptide and that of the MtFKBP17-catalyzed isomerization became smaller (77) (figure 5). This suggests that PPIase activity at least for small peptides is less important at higher temperature. Most of hyperthermophilic or thermophilic archaea have no

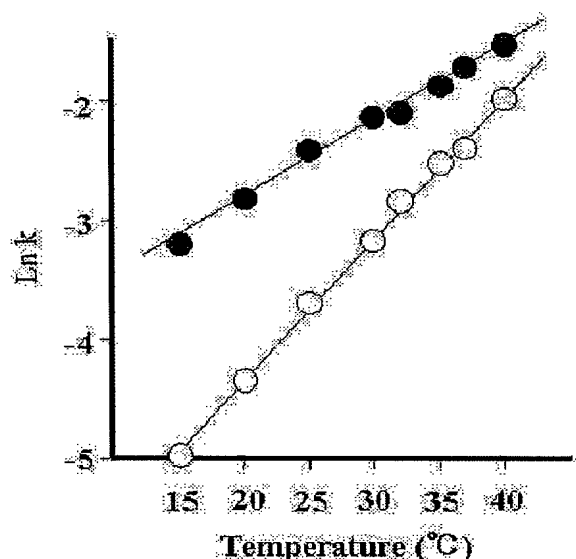


Figure 5. Effect of temperature on the first-order rate constant (K) of *cis-trans* isomerization measured using tetrapeptide substrate and chymotrypsin coupled assay. Open circles, absence of PPIase; closed circles, presence of MTFK (MtFKBP17) (76).

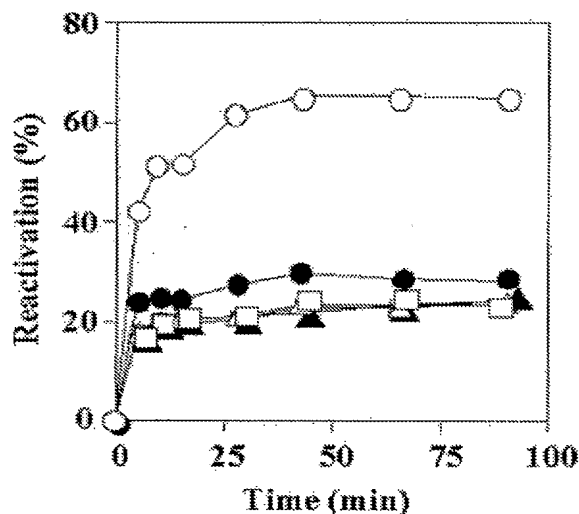


Figure 6. Effect of PPIases on the refolding of denatured rhodanese. The 6 M guanidine hydrochloride-denatured rhodanese was diluted 60 fold at time 0 min. with the refolding buffer (10 mM DTT, 50 mM Na-thiosulfate, and 50 mM K-phosphate (pH 7.8) containing PPIase at 25°C. Open squares, absence of PPIase; open circles, 5 microM recombinant MtFKBP17; closed circles, 5 microM recombinant MtFKBP17 with 20 microM FK506; closed triangles, 5 microM recombinant human HsFKBP12; open triangles, 5 microM bovine BtCyP18 (84).

cyclophilin but FKBP of which PPIase activities are lower than those of other PPIases from mesophiles at low

temperature (table 4). These archaeal FKBP s may have higher activity at higher temperature and/or may have some other functions in addition to the PPIase activity.

3.4. Chaperone-like activity of a short-type archaeal FKBP

Two different model substrate proteins, RNase-T1 (ribonuclease T1) and rhodanese, have been used to study the protein folding activity of a short type archaeal FKBP (84). RNase-T1 is completely refoldable and has two *cis* peptidyl-prolyl bonds (Tyr38-Pro39 and Ser54-Pro55) (38). On the other hand, folding intermediates of rhodanese tend to aggregate and thus rhodanese is convenient to assess the activity of chaperones by measuring their capacity to prevent aggregation of folding intermediates and to increase the yield of properly folded rhodanese. *Escherichia coli* GroE binds to folding intermediates of rhodanese and releases them in an ATP-dependent fashion (85, 86).

MtFKBP17 accelerates the refolding of 8M urea-denatured RNase-T1 in a dose-dependent fashion. This PPIase activity of MtFKBP17 is completely inhibited by FK506 (84). MtFKBP17 protects aggregation of folding intermediates and elevated the final recovery of rhodanese refolding in dose-dependent fashion (figure 6) (84). This is called chaperone-like activity of MtFKBP17 and is partially inhibited by FK506. Neither hFKBP12 nor bovine cyclophilin 18kDa (bCyP18) exhibits chaperone-like activity in rhodanese refolding. The k_{cat}/K_m values (PPIase activity) of HsFKBP12, BtCyP18, and the recombinant MtFKBP17 for N-suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA are 2.7 (87), 0.64 - 2.2 (80, 87), and 0.96 - 1.0 (84) micro $M^{-1}s^{-1}$, respectively. These raise the question whether the PPIase activity of MtFKBP17 contributes the chaperone-like activity or not.

3.5. Deletion analysis of the short-type FKBP from *M. thermolithotrophicus*

The role of the insertion sequences of a short type archaeal FKBP, MtFKBP17, in protein folding has been analyzed by making deletion mutants (84) (figure 4). Catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of PPIase activity of the mutant with deletion of the bulge insertion (FK-dB), or both bulge and flap insertions (FK-dBF), was dramatically reduced to 0.4 and 0.6% as compared with the wild type MtFKBP17 (FK-W), respectively. The PPIase activity of the mutant lacking the flap insertion (FK-dF) was undetectable. The far-UV circular dichroism (CD) spectral analysis revealed that the both bulge and flap insertions are important for a proper conformation of MtFKBP17 (84). While the secondary structure of FK-dB was shown to be changed, 62% of chaperone-like activity of the wild type remained (table 5). On the other hand, FK-dF that has an almost intact secondary structure exhibited little chaperone-like and undetectable PPIase activities. This suggests that the flap insertion sequence is important for the chaperone-like activity of MtFKBP17, and that the contribution of PPIase activity to chaperone-like activity is low.

Table 5. Deletion analysis of MTFK (MtFKBP17)

MTFKs	PPIase activity ^a	Chaperone-like activity ^b
	kcat/K _m (μM ⁻¹ S ⁻¹)	% of rhodanese activity ^c
Wild type (FK-W)	0.96 (100%) ^d	64.2±2.8 (100%) ^d
FK-W + FK506	0 (0%) ^d	30.0±0.7 (16%) ^d
none ^e	0 (0%) ^d	14.1±0.4 (0%) ^d
FK-dB	0.004 (0.4%) ^d	45.3±1.7 (62%) ^d
FK-dF	undetectable ^f (0%) ^d	14.5±0.4 (0.8%) ^d
FK-dBF	0.006 (0.6%) ^d	15.4±0.7 (2.6%) ^d

^a, PPIase activity was assayed at 25 °C by the chymotrypsin-coupled assay in 50mM K-phosphate buffer (pH7.5). ^b, For chaperone activity, the denatured rhodanese (37.8 μM) was 60-fold diluted in the presence of 5.0 μM mutants, or FK-W in 50mM K-phosphate buffer (pH7.8) containing 10mM DTT and 50mM Na thiosulfate at 35°C. ^c, Recovered rhodanese activity after 60min refolding in the presence of FKBP. Means ± S.D. (n=3). ^d, percentage in parenthesis indicates relative yield of refolded rhodanese to that by wild type (FK-W). ^e, Spontaneous refolding of rhodanese without PPIase, ^f, No PPIase activity was detected with 5 μM mutant MtFKBP17.

Table 6. PPIase and chaperone-like activities of amino-acid substitution mutants of MtFKBP17 (MTFK) from *M. thermolithotrophicus*

MTFKs	PPIase activity	Chaperone-like activity ^b
	[k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ S ⁻¹)] ^a	[% of rhodanese activity] ^c
rMtFKBP17 ^d	1.0 (100%) ^e	66.7 ± 3.3 (100%) ^e
FK-dB	0.005 (0.5%) ^e	49.3 ± 3.4 (65%) ^e
F141Y	0.072 (7.2%) ^e	20.6 ± 1.6 (8.3%) ^e
F21Y/D22V	0.013 (1.3%) ^e	67.4 ± 4.1 (101%) ^e
G4R/F21Y/D22V	0.009 (1.0%) ^e	62.7 ± 3.3 (92%) ^e
G13R/F21Y/D22V	0.006 (0.6%) ^e	32.4 ± 2.6 (32%) ^e
G18R/F21Y/D22V	0.014 (1.4%) ^e	66.8 ± 2.5 (100%) ^e
None ^f	n.m. ^g	16.4 ± 1.5 (0%) ^e

^a, PPIase activity was assayed at 25°C by chymotrypsin-coupled assay in 50mM K-phosphate buffer (pH7.5). ^b, For chaperone activity, the denatured rhodanese (37.8 μM) was diluted 60-fold in the presence of 5.0 μM mutants or wild type recombinant MTFK in 50mM K-phosphate buffer (pH7.8) containing 10mM DTT and 50mM Na thiosulfate at 35°C. ^c, Recovered rhodanese activity after 60min refolding in the presence of FKBP. Mean ± S.D. (n=3). ^d, recombinant wild type MtFKBP17. ^e, percentage in the parenthesis indicates relative folding yield to that by wild type (rMtFKBP17). ^f, Spontaneous refolding of rhodanese without PPIase. ^g, Not measured.

3.6. Is chaperone activity of MtFKBP17 independent of PPIase activity ?

The contribution of MtFKBP17 PPIase activity to chaperone-like activity has been estimated by analyzing amino-acid substitution mutants with reduced PPIase activities (figure 4) (84). The CD spectra of the substitution mutants, F21Y/D22V, G4R/F21Y/D22V, G18R/F21Y/D22V, and F141Y, indicated that the secondary structure was intact in these mutants (84). While the double mutant, F21Y/D22V exhibited 1.3% of the PPIase activity of wild-type (FK-W), it exhibited chaperone-like activity comparable to that of FK-W (table 6) (84). This indicates that F21 and D22 are important for PPIase activity, but not for chaperone-like activity. The triple mutants, both G4R/F21Y/D22V and G18R/F21Y/D22V also exhibited little PPIase activity, but their chaperone-like activities remained almost intact. While PPIase activity of F21Y/D22V was lower than that of F141Y which has a dramatically reduced chaperone-like activity, it showed intact chaperone activity. The amino-acid residue F141 is probably important not only for PPIase

but also for chaperone-like activity. These mutation analyses indicate that chaperone-like activity of MtFKBP17 is independent of PPIase activity. The three dimensional (3-D) structure of MtFKBP17 is currently being determined to understand the mechanism underlying its chaperone-like activity (88).

3.7. The long-type archaeal FKBP

The 28 kDa archaeal long-type FKBP has a FKBP-domain similar to archaeal 17 kDa short-type FKBP, and an additional peptide with 100 amino-acid residues at the C-terminal region. The PPIase activity of MbtFKBP28 was not sensitive to FK506 and was much lower than those of other FKBP reported (table 4) (82). While A103, E106, and A120 of MtFKBP17 are conserved in other archaeal short-type FKBP, the corresponding residues are substituted with other amino acids in the long-type FKBP (82). These substitutions may be the cause for the low PPIase activity of the long type FKBP, MbtFKBP28. However, MbtFKBP28 was recently shown to prevent aggregation of folding intermediates of 8M urea-denatured

Archaeal PPIases

rhodanese in a dose dependent-fashion (82). The C-terminal domain of MbtFKBP28 has high content of acidic amino-acid residues (29.0%). The previous studies have revealed that the acidic region of the C-termini of human cyclophilin 40 kDa and HsFKBP52 are important for the interaction with hsp90 (89). The acidic amino acid-rich C-terminal region of MbtFKBP28 may be important for the suppression of protein aggregation (82). Other archaeal long type FKBP also have acidic amino acid-rich region (figure 3). This suggests that the aggregation-suppressing activity may be a common feature of archaeal long type FKBP.

4. PERSPECTIVES

In vivo-function of archaeal PPIases is yet enigmatic. In high temperature environments, where hyperthermophiles and thermophiles thrive, PPIase activity may be less important because of high spontaneous rotation rate of the peptidyl-prolyl bond. Besides the PPIase activity, the hyperthermophilic and thermophilic archaeal FKBP seem to have chaperone-like activity or aggregation-suppression activity that may be more important at high temperature. In addition, hyperthermophilic archaea lack some chaperones like DnaK, DnaJ and GrpE (90) and cyclophilin type PPIase (see the section 3.1). This suggests that these hyperthermophilic archaea do not need these protein folding factors like DnaK and trigger factor, or that the fewer kinds of protein folding factors are multifunctional and fulfil the requirements for the protein folding in the cells of hyperthermophilic archaea, or that they have unknown new protein folding factors. To understand the *in vivo*-function of archaeal PPIases, the following questions are ought to be answered.

In the first place, a question arises whether PPIases, CyP and/or FKBP, are essential for their growth or not. In yeast, all the CyP and FKBP genes except ESS1 (ScPvn19) are dispensable (8, 29). Gene manipulation techniques for hyperthermophilic archaea are required to answer this question, especially considering that for these archaea genetic analysis is not yet fully developed (91).

In *Escherichia coli*, trigger factor (EcFKBP48) is reported to associate with ribosomes (92) and collaborate with DnaK in nascent protein folding (25). Hyperthermophilic archaea lack both the factor and the chaperone in their genomes. It is pertinent to ask whether archaeal FKBP functions as a trigger factor. To answer this question, the *in vitro* translation technique developed for *Sulfolobus solfataricus* (93) may be useful.

A short type archaeal FKBP, MtFKBP17, has chaperone-like activity in addition to the PPIase activity (84). Because little information is available at present, it is not known whether this is a general character of archaeal FKBP. It is interesting to study the mechanisms underlying the chaperone-like activity of archaeal FKBP. Analysis of the 3-D structure of MBTFKBP17 will contribute to the understanding of the mechanism.

Some enzymes from hyperthermophiles have unique properties that manifest themselves in the face of heat treatment. When *Pyrococcus* glutamate dehydrogenase is expressed in *E. coli* as a recombinant protein, its activity is elevated by heat treatment (94). The heat treatment is thought to affect the monomer structure and facilitate hexamer formation (95). This may indicate that these proteins are in a transient metastable state at lower temperature and require heat energy to take a proper structure. It would be interesting whether chaperones or PPIases are involved in this transition from the intermediate or metastable state to a properly-folded stable enzyme.

Expression of yeast CyP1 (ScCyP17) is heat inducible but that of FKBP1 (ScFKBP12) is not (96). Disruption of the CyP1 gene decreases the survival at high temperature. Expression of the *Vicia faba* (plant) FKBP (VfFKBP13) is also heat inducible (97). On the other hand, *E. coli* trigger factor (EcFKBP48) is a cold-shock protein and is thought to contribute to viability at low temperature (98). It is not yet clear whether the archaeal CyP and/or FKBP are a cold- or heat-shock protein or not.

Many PPIases are known to bind to other proteins to form a heterocomplex. Human FKBP52 (HsFKBP52) and HsCyP40 bind to steroid receptor (16, 21). No WW- or TRP- or Leu. rich-domain has been found in archaeal FKBP or CyPs. However, it is possible that the PPIase bind to other cellular proteins to form a heterocomplex. Cross-linking experiments may answer this question.

Although some archaea, especially hyperthermophilic archaea, lack some chaperones, they have group II chaperonin, small heat shock protein and prefoldin (for review see 76). It is still a question whether archaeal PPIase (CyP or FKBP) collaborate with these protein folding factors in protein folding.

What is the functional differentiation between CyPs and FKBP in archaeal cells? Most hyperthermophilic archaea so far studied have only one PPIase (FKBP). However, *M. thermoautotrophicum* have both CyP and FKBP, and *M. jannaschii* have two types of FKBP. Functional differentiation between these PPIases remains to be elucidated.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

A. Ideno is acknowledged for critical discussion on the manuscript. We thank T. Iwabuchi for drawing the chemical structures of PPIase inhibitors. We are grateful to E. Conway de Macario for critical comments on the manuscript. This study was conducted at the Marine Biotechnology Institute of Japan as part of The Basic Knowledge Creation and Development program supported by the New Energy and Industrial Technology Development Organization of Japan.

6. REFERENCES

1. Fischer, G., J.Bang, & C. Mech: Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans*-isomerisierung der

- Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomed Biochem Acta* 43, 1001-1111 (1984)
2. Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber & F. X. Schmid: Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476-478 (1989)
3. Takahashi, N., T. Hayano & M. Suzuki: Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337, 473-475 (1989)
4. Harding, M. W., A. Galat, D.E. Uehling & S. L. Schreiber: A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758-760 (1989)
5. Bierer, B. E., P.K. Somers, T.J. Wandless, S. J. Burakoff & S. L. Schreiber: Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand. *Science* 250, 556-559 (1990)
6. Rahfeld, J.U., K.P. Rucknagel, B. Schelbert, B. Ludwig, J. Hacker, K. Mann & G. Fischer: Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett* 352, 180-184 (1994)
7. Fraser, C.M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, J. L. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J. T. Brian, A. Dougherty, K. F. Bott, P.-C. Hu, T. S. Jucier, S. N. Peterson, J. O. Smith, C. A. Hutchison III & J. C. Venter: The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 397-403 (1995)
8. Dolinski, K., S. Muir, M. Cardenas & J. Heitman: All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13093-13098 (1997)
9. Haendler, B., R. Hofer-Warbinek & E. Hofer: Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO J* 6, 947-950 (1987)
10. Wu, J., M. J. Matunis, D. Kraemer, G. Blobel & E. Coutavas: Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* 270, 14209-14213 (1995)
11. Liu, J., C. M. Chen & C. T. Walsh: Human and *Escherichia coli* cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry* 30, 2306-2310 (1991)
12. Hayano, T., N. Takahashi, S. Kato, N. Maki & M. Suzuki: Two distinct forms of peptidylprolyl-*cis-trans*-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells. *Biochemistry* 30, 3041-3048 (1991)
13. Göthel, S. F., M. Herrler & M. Marahiel: Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of *Bacillus subtilis*: identification of residues involved in cyclosporin A affinity and catalytic efficiency. *Biochemistry* 35, 3636-3640. (1996)
14. Ke, H. M., L. D. Zydney, J. Liu & C. J. Walsh: Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9483-9787 (1991)
15. Braaten, D., E. K. Franke & J. Luban: Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* 70, 3551-3560 (1996)
16. Ratajczak, T., A. Carrello, P. J. Mark, B. J. Warner, R. J. Simpson, R. L. Moritz & A. K. House: The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J Biol Chem* 268, 13187-13192 (1993)
17. Kyrpides, N. C. & C. R. Woese: Tetratricopeptide-repeat proteins in the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Trends Biochem Sci* 23, 245-247 (1998)
18. Maki, N., F. Sekiguchi, J. Nishimaki, K. Miwa, T. Hayano, N. Takahashi & M. Suzuki: Complementary DNA encoding the human T-cell FK506-binding protein, a peptidylprolyl *cis-trans* isomerase distinct from cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5440-5443 (1990)
19. Van Duyne, G. D., R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber & J. Clardy: Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science* 252, 839-842 (1991)
20. Moore, J. M., D. A. Peattie, M. J. Fitzgibbon & J. A. Thomson: Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506. *Nature* 351, 248-250 (1991)
21. Peattie, D. A., M. W. Harding, M. A. Fleming, M. T. DeCenzo, J. A. Lippke, D. J. Livingston & M. Benasutti: Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10975-10978 (1992)
22. Hottenrott, S., T. Schumann, A. Pluckthun, G. Fischer & J. U. Rahfeld: The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase. *J Biol Chem* 272, 15697-15701 (1997)
23. Stoller, G., K. P. Rucknagel, K. H. Nierhaus, F. X. Schmid, G. Fischer & J. U. Rahfeld: A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J* 14, 4939-4948 (1995)

24. Zarnt, T., T. Tradler, G. Stoller, C. Scholz, F. X. Schmid & G. Fischer: Molecular structure of the trigger factor required for high affinity in protein folding. *J Mol Biol* 271, 827-837 (1997).
25. Deuerling, E., A. Schulze-Specking, T. Tomoyasu, A. Mogk & B. Bukau: Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* 400, 693-696 (1999)
26. Deckert, G., P. V. Warren, T. Gaasterland, W. G. Young, A. L. Lenox, D. E. Graham, R. Overbeek, M. A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R. A. Feldman, J. M. Short, G. J. Olson & R. V. Swanson: The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392, 353-358 (1998)
27. Nelson, K. E., R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter & C. M. Fraser: Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399, 323-329 (1999)
28. Rouvière, P. E & C. A. Gross: SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* 10, 3170-3182 (1996)
29. Lu, K. P, S. D. Hanes & T. Hunter: A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380, 544-547 (1996)
30. Lu, P. J., X. Z. Zhou, M. Shen & K. P. Lu: Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283, 1325-1328 (1999)
31. Hennig, L., C. Christner, M. Kipping, B. Schelbert, K. P. Rucknagel, S. Grabley, G. Kullertz & G. Fischer: Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglone. *Biochemistry* 37, 5953-5960 (1998)
32. Schreiber, S. & G. R. Crabtree: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today* 13, 136-142 (1992)
33. Abraham, R. T. & G. J. Wiederrecht: Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 14, 483-510 (1996)
34. Harisson, R. K. & R.L. Stein: Mechanistic studies of peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase: evidence for catalysis by distortion. *Biochemistry* 29, 1684-1689 (1990)
35. Janowski, B., M. Wöllner, M. Schutkowski & G. Fischer: A protease-free assay for peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase using standard peptide substrates. *Anal Biochem* 252, 299-307 (1997)
36. Scholz, C., T. Schindler, K. Dolinski, J. Heitman & F. X. Schmid: Cyclophilin active site mutants have native prolyl isomerase activity with a protein substrate. *FEBS Lett* 414, 69-73 (1997)
37. Kern, D., G. Kern, G. Scherer, G. Fischer & T. Drakenberg: Kinetic analysis of cyclophilin-catalyzed prolyl *cis/trans* isomerization by dynamic NMR spectroscopy. *Biochemistry* 34, 13594-13602 (1995)
38. Schönbrunner, E.R., S. Mayer, M. Tropsch, G. Fischer, N. Takahashi & F.X. Schmid: Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *J Biol Chem* 266, 3630-3635 (1991)
39. Mücke, M. & F.X. Schmid: Enzymatic catalysis of prolyl isomerization in an unfolding protein. *Biochemistry* 31, 7848-7854 (1992)
40. Mücke, M. & F.X. Schmid: Folding mechanism of ribonuclease T1 in the absence of the disulfide bonds. *Biochemistry* 33, 14608-14619 (1994)
41. Steinmann, F., P. Bruckner & A. Superti-Furga: Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation *in vivo*: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase. *J Biol Chem* 266, 1299-1303 (1991)
42. Schneuwly, S., R. D. Shortridge, D. C. Larrivee, T. Ono, M. Ozaki & W. L. Pak: *Drosophila ninaA* gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporine A binding protein). *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5390-5394 (1989)
43. Baker, E. K., N. J. Colley & C. S. Zuker: The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex *in vivo* with its protein target rhodopsin. *EMBO J* 13, 4886-4895 (1994)
44. Lenhard, T. & H. Reilander: Engineering the folding pathway of insect cells: generation of a stably transformed insect cell line showing improved folding of a recombinant membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 823-30 (1997)
45. Partaledis, J. A. & V. Berlin: The FKB2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the immunosuppressant-binding protein FKBP-13, is regulated in response to accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5450-5454 (1993)
46. Schönbrunner, E. R. & F. X. Schmid: Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase improves the efficiency of protein disulfide isomerase as a catalyst of protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4510-4513 (1992)
47. Smith, T., L. R. Ferreira, C. Hebert, K. Norris & J. J. Sauk: Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic

reticulum with procollagen into pre-Golgi intermediate vesicles. A role for Hsp47 and cyclophilin B in the export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270, 18323-18328 (1995)

48. Scholz, C., J. Rahfeld, G. Fischer & F.X. Schmid: Catalysis of protein folding by parvulin. *J Mol Biol* 273, 752-762 (1997).

49. Freskgård, P. O., N. Bergenhem, B. H. Jonsson, M. Svensson & U. Carlsson: Isomerase and chaperone-like activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science* 258, 466-468 (1992)

50. Rinfret, A., C. Collins, R. Menard & S. K. Anderson: The N-terminal cyclophilin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidylprolyl *cis-trans*-isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* 33, 1668-1673 (1994)

51. Kern, G., D. Kern, F. X. Schmid & G. Fischer: Reassessment of the putative chaperone function of prolyl-*cis/trans*-isomerases. *FEBS Lett* 348, 145-148 (1994)

52. Lilie, H., K. Lang, R. Rudolph & J. Buchner: Prolyl isomerases catalyze antibody folding *in vitro*. *Protein Sci* 2, 1490-1496 (1993)

53. Bose, S., T. Weikl, H. Bügl & J. Buchner: Chaperone function of hsp90-associated proteins. *Science* 274, 1715-1717 (1996)

54. Lu, P. J., G. Wulf, X. Z. Zhou, P. Davies, K. P. Lu: The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399, 784-788 (1999)

55. Pratt, W.B. & D. O. Toft: Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-360 (1997)

56. Montague, J.W., F. M. Jr. Hughes, J. A. Cidlowski: Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl *cis-trans*-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis. *J Biol Chem* 272, 6677-6684 (1997)

57. Crompton, M.: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341, 233-249 (1999)

58. Marks, A.: Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev* 76, 631-649 (1996)

59. Singh, B. B., H. H. Patel, R. Roepman, D. Schick & P. A. Ferreira: The zinc finger cluster domain of RanBP2 is a specific docking site for the nuclear export factor, exportin-1. *J Biol Chem* 274, 37370-37378 (1999)

60. Fischer, G., H. Bang, B. Ludwig, K. Mann & J. Hacker: Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-*cis/trans* isomerase (PPIase) activity. *Mol Microbiol* 6, 1375-1383 (1992)

61. Lyon, W. R., C. M. Gibson & M. G. Caparon: A role for trigger factor and an rgg-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. *EMBO J* 17, 6263-6275 (1998)

62. Bell, A., H. C. Roberts & L. H. Chappell: The antiparasite effects of cyclosporin A: possible drug targets and clinical applications. *Gen Pharmacol* 27, 963-971 (1996)

63. Aiken, C.: Mechanistic independence of Nef and cyclophilin A enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *Virology* 248, 139-147 (1998)

64. Gold, B. G.: FK506 and the role of the immunophilin FKBP-52 in nerve regeneration. *Drug Metab Rev* 31, 649-663 (1999)

65. Doyle, V., S. Virji & M. Crompton: Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochem J* 341, 127-132 (1999)

66. Nagashima, K., S. Mitsuhashi, K. Kamino & T. Maruyama: Cyclosporin A sensitive A sensitive peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase in a halophilic archaeum, *Halobacterium cutirubrum*. *Biochem Biophys Res Comm* 198, 466-472 (1994)

67. Iida, T., M. Furutani, T. Iwabuchi & T. Maruyama: Gene for a cyclophilin-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase from a halophilic archaeum, *Halobacterium cutirubrum*. *Gene* 204, 139-144 (1997)

68. Smith, D. R., L. A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, D. Harrison, L. Hoang, P. Keagle, W. Lumm, B. Pothier, D. Qiu, R. Spadafora, R. Vicaire, Y. Wang, J. Wierzbowski, R. Gibson, N. Jiwan, A. Caruso, D. Bush, H. Safer, D. Patwell, S. Prabhakar, S. McDougall, G. Shimer, A. Goyal, S. Petrokovski, G. M. Church, C. J. Daniels, J.-I. Mao, P. Rice, J. Nöling & J. N. Reeve: Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* 179, 7135-55 (1997)

69. Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. FitzGerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. M. Geoghagen, J. F. Weidman, J. L. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, J. K. Kelley, J. D. Peterson, P. W. Sadow, M. C. Hanna, M. D. Cotton, K. M. Roberts, M. A. Hurst, B. P. Kaine, M. Borodovsky, H.-P. Klenk, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese & J. C. Venter: Complete genome sequence of the methanogenic archaeum, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073 (1996)

70. Klenk, H. P., R. A. Clayton, J. F. Tomb, O. White, K. E. Nelson, K. A. Ketchum, R. J. Dodson, M. Gwinn, E. K.

- Hickey, J. D. Peterson, D. L. Richardson, A. R. Kerlavage, E. Graham, N. C. Kyrpides, R. D. Fleischmann, J. Quackenbush, N. H. Lee, G. G. Sutton, S. Gill, E. F. Kirkness, B. A. Dougherty, K. McKenney, M. D. Adams, B. Loftus, S. Peterson, C. I. Reich, L. K. McNeil, J. H. Badger, A. Glodek, L. Zhou, R. Overbeek, J. D. Gocayne, J. F. Weidman, L. McDonald, T. Utterback, M. D. Cotton, T. Spriggs, P. Artiack, B. P. Kaine, S. M. Sykes, P. W. Sadow, K. P. D'Andrea, C. Bowman, C. Fujii, S. A. Garland, T. M. Mason, G. J. Olsen, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese & J. C. Venter: The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390, 364-370 (1997)
71. Kawarabayasi, Y., M. Sawada, H. Horikawa, Y. Haikawa, Y. Hino, S. Yamamoto, M. Sekine, S. Baba, H. Kosugi, A. Hosoyama, Y. Nagai, M. Sakai, K. Ogura, R. Otsuka, H. Nakazawa, M. Takamiya, Y. Ohfuku, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. Aoki, T. Yoshizawa, Y. Nakamura, F. T. Robb, K. Horikoshi, Y. Masuchi, H. Shizuya & H. Kikuchi: Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res* 5, 55-76 (1998)
72. Kawarabayasi, Y., Y. Hino, H. Horikawa, S. Yamazaki, Y. Haikawa, K. Jin-no, M. Takahashi, M. Sekine, S. Baba, A. Ankai, H. Kosugi, A. Hosoyama, S. Fukui, Y. Nagai, K. Nishijima, H. Nakazawa, M. Takamiya, S. Masuda, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. Aoki, K. Kubota, Y. Nakamura, N. Nomura, Y. Sako & H. Kikuchi: Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res* 6, 83-101, 145-152 (1999)
73. Szabo, A., T. Langer, H. Schroder, J. Flanagan, B. Bukau & F. U. Hartl: The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10345-10349 (1994)
74. Langer, T., C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M.K. Hayer & F. U. Hartl: Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356, 683-689 (1992)
75. Stuart, R.A., D. M. Cyr, E. A. Craig & W. Neupert: Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *Trends Biochem. Sci.* 19, 87-92 (1994)
76. Macario, A. J., M. Lange, B. K. Ahring, E. Conway de Macario: Stress genes and proteins in the archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 923-967 (1999)
77. Furutani, M., T. Iida, S. Yamano, K. Kamino & T. Maruyama: Biochemical and genetic characterization of an FK506-sensitive peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase from a thermophilic archaeon, *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J Bacteriol* 180, 388-394 (1998)
78. Iida, T., M. Furutani, F. Nishida & T. Maruyama: FKBP-type peptidyl *cis-trans* isomerase from a sulfur-dependent hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. KS-1. *Gene* 222, 249-255 (1998)
79. Callebaut, I. & J.-P. Mornon: Trigger factor, one of the *Escherichia coli* chaperone proteins, is an original member of the FKBP family. *FEBS Lett* 374, 211-215 (1995)
80. Harrison, R.K. & R.L. Stein: Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* 29, 3813-3816 (1990)
81. Compton, L. A., J. M. Davis, J. R. Macdonald & H. P. Bächinger: Structural and functional characterization of *Escherichia coli* peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases. *Eur J Biochem* 206, 927-934 (1992)
82. Ideno, A., T. Yoshida, M. Furutani & T. Maruyama: The 28.3 kDa FK506 binding protein from a thermophilic archaeum, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, protects the denaturation of proteins *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 267, 3139-3149 (2000)
83. Tradler, T., G. Stoller, K.P. Rücknagel, A. Schierhohn, J.-U. Rahfeld & G. Fischer: Comparative mutational analysis of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase: active sites of *Escherichia coli* trigger factor and human FKBP12. *FEBS Lett* 407, 184-190 (1997)
84. Furutani, M., A. Ideno, T. Iida & T. Maruyama: FK506 binding protein from a thermophilic archaeon, *Methanococcus thermolithotrophicus* has chaperone-like activity *in vitro*. *Biochemistry* 39, 453-462 (2000)
85. Martin, J., T. Langer, R. Boteva, A. Schramel, A. L. Horwich & F. U. Hartl: Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature* 352, 36-42 (1991)
86. Hayer-Hartl, M. K., J. Martin & F. U. Hartl: Asymmetrical interaction of GroEL and GroES in the ATPase cycle of assisted protein folding. *Science* 269, 836-841 (1995)
87. Fischer, G.: Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases and their effectors. *Angew Chem Int Ed* 33, 1415-1436 (1994)
88. Suzuki, R., K. Nagata, M. Kawakami, N. Nemoto, M. Furutani, K. Adachi, T. Maruyama & M. Tanokura: Assignment of ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonances of FKBP from *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J Biomol NMR* (in press) (2000)
89. Ratajczak, T. & A. Carrello: Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding. *J Biol Chem* 271, 2961-2965 (1996)
90. Macario, A. J. L. & E. Conway de Macario: The archaeal molecular chaperone machine: peculiarities and paradoxes. *Genetics* 152, 1277-1283 (1999)

Archaeal PPIases

91. Noll, K. M. & M. Yargas: Recent advances in genetic analyses of hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *Arch Microbiol* 168, 73-80 (1997)
92. Hesterkamp, T., S. Hauser, H. Lutcke & B. Bukau: *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4437-4441 (1996)
93. Condo, I., A. Ciammaruconi, D. Benelli, D. Ruggero & P. Londei: *Cis*-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 34, 377-384 (1999)
94. Diruggiero, J. & F. T. Robb: Expression and *in vitro* assembly of recombinant glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* 61, 159-64 (1995)
95. Rahman, R. N., S. Fujiwara, M. Takagi, S. Kanaya & T. Imanaka: Effect of heat treatment on proper oligomeric structure formation of thermostable glutamate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 646-652 (1997)
96. Sykes, K., M. J. Gething & J. Sambrook: Proline isomerases function during heat shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5853-5857 (1993)
97. Luan, S., J. Kudla, W. Gruissem & S. L. Schreiber: Molecular characterization of a FKBP-type immunophilin from higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6964-6969 (1996)
98. Kandror, O. & A. L. Goldberg: Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4978-81 (1997)

Key Words: PPIase, FKBP, cyclophilin, protein folding, chaperone, Archaea, Review

Send correspondence to: Dr Tadashi Maruyama, Marine Biotechnology Institute, Kamaishi Laboratories, 3-75-1 Heita, Kamaishi-shi, Iwate 026-0001, Japan, Tel: +81-193-26-5814, Fax: +81-193-26-6584, E-mail: tadashi.maruyama@kamaishi.mbio.co.jp

This manuscript is available on line at:

<http://www.bioscience.org/2000/d/maruyama/fulltext.htm>